

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

DIALOG(R) File 347:JAPIO

(c) 1999 JPO & JAPIO. All rts. reserv.

05338887

NEW MICROORGANISM, DECOMPOSITION OF ORGANIC COMPOUND BY USING THE SAME AND ENVIRONMENTAL RESTORATION BY USING THE SAME

PUB. NO.: 08-294387 [J P 8294387 A]

PUBLISHED: November 12, 1996 (19961112)

INVENTOR(s): IMAMURA TAKESHI

YANO TETSUYA

FURUSAKI SHINYA

KAWAGUCHI MASAHIRO

KAWABATA YUJI

APPLICANT(s): CANON INC [000100] (A Japanese Company or Corporation), JP (Japan)

APPL. NO.: 08-041100 [JP 9641100]

FILED: February 28, 1996 (19960228)

INTL CLASS: [6] C12N-001/20; A62D-003/00; B09C-001/10; C02F-003/34; C12N-001/20; C12R-001/15

JAPIO CLASS: 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY -- Microorganism Industry); 13.1 (INORGANIC CHEMISTRY -- Processing Operations); 28.1 (SANITATION -- Sanitary Equipment); 32.0 (POLLUTION CONTROL -- Anti-pollution Treatment); 32.2 (POLLUTION CONTROL -- Waste Water Treatment)

#### ABSTRACT

PURPOSE: To provide a new microorganism consisting of the mutant of a microorganism capable of generating an oxygenase with an inducing substance obtained by applying a mutation inducing treatment using a mutagen, and having the function of biologically decomposing organic chlorine compounds and aromatic compounds.

CONSTITUTION: This new microorganism Corynebacterium species JM1 (FERM-BP-5352) capable of constitutionally generating an oxygenase enzyme without an inducing substance, having the function of biologically and structurally decomposing organic chlorine compounds and aromatic compounds of environmental polluting substances, and useful for the cleaning of polluted environmental, is obtained by inoculating the colony of Corynebacterium species J1 (FERM-BP-5102), a microorganism capable of generating the oxygenase with the inducing substance, on a medium, incubating by shaking at 30 deg.C for 18hr, then collecting microbes by separating with a centrifuge, adding a medium containing N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine of a mutagen and phenol, incubating by shaking at 30 deg.C for applying a mutation inducing treatment.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-294387

(43) 公開日 平成8年(1996)11月12日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/20		8828-4B	C 1 2 N 1/20	A
		8828-4B		D
		8828-4B		F
A 6 2 D 3/00	Z A B		A 6 2 D 3/00	Z A B
B 0 9 C 1/10	Z A B		C 0 2 F 3/34	Z A B Z
審査請求 未請求 請求項の数85 O L (全 26 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平8-41100

(22) 出願日 平成8年(1996)2月28日

(31) 優先権主張番号 特願平7-40377

(32) 優先日 平7(1995)2月28日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(31) 優先権主張番号 特願平7-40380

(32) 優先日 平7(1995)2月28日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000001007

キヤノン株式会社

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

(72) 発明者 今村 剛士

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ  
ノン株式会社内

(72) 発明者 矢野 哲哉

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ  
ノン株式会社内

(72) 発明者 古崎 真也

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ  
ノン株式会社内

(74) 代理人 弁理士 若林 忠

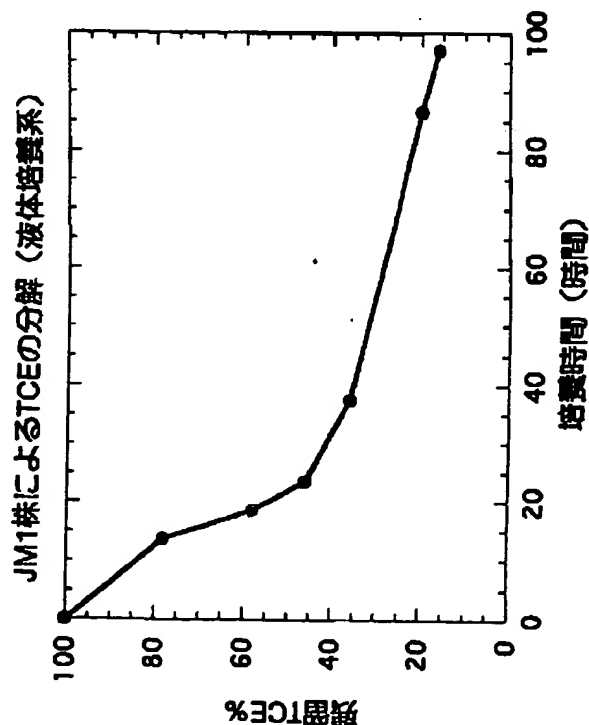
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規微生物、それを用いた有機化合物の分解方法及びそれを用いた環境修復方法

## (57) 【要約】

【課題】 オキシゲナーゼを構成的に発現する微生物、即ち有機塩素化合物及び芳香族化合物を誘導基質を要求することなく構造的に生物分解する能力を備えた新規な微生物及びこれを用いる各種汚染環境の浄化方法を提供すること及びこの微生物を誘導基質要求性微生物から分離する方法の提供。

【解決手段】 新規微生物 J M 1 を用いる。又、オキシゲナーゼについての前駆物質とオキシゲナーゼについての誘導物質を含有する培地に、被験微生物とオキシゲナーゼを誘導的に発現する微生物を共存させて培養し、後者の微生物のオキシゲナーゼによる酸化生成物の検出に先立ってオキシゲナーゼによる酸化生成物の存在を示す培養物部分を取り別けてそれから微生物を分離する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 オキシゲナーゼ酵素を 成的に発現している新規微生物であって、該微生物は、誘導物質によってオキシゲナーゼを発現することのできる微生物の、変異源を用いた変異誘発処理を施して得られた変異体であることを特徴とする新規微生物。

【請求項2】 該変異源が紫外線、エチルメタンスルホネート、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、亜硝酸及びアクリジン色素から選ばれる請求項1の新規菌株。

【請求項3】 前記誘導物質によってオキシゲナーゼを発現可能な微生物がコリネバクテリウム・スピーシズJ1 (*Corynebacterium* sp. J1) (FERM BP-5102)である請求項1の微生物。

【請求項4】 前記オキシゲナーゼを構成的に発現している微生物がコリネバクテリウム・スピーシズに属する請求項1の微生物。

【請求項5】 該有機化合物が芳香族化合物である請求項1の微生物。

【請求項6】 該芳香族化合物がフェノール、トルエン及びクレゾールの少なくとも一つである請求項5の微生物。

【請求項7】 該有機化合物が塩素化脂肪族炭化水素化合物である請求項1の微生物。

【請求項8】 該塩素化脂肪族炭化水素化合物がトリクロロエチレン及びジクロロエチレンの少なくとも一方である請求項7の微生物。

【請求項9】 該オキシゲナーゼが該有機化合物を芳香族分解経路によって分解可能な物である請求項1の微生物。

【請求項10】 前記オキシゲナーゼを構成的に発現している微生物がコリネバクテリウム・スピーシズJM1 (*Corynebacterium* sp. JM1) (FERM BP-5352)である請求項1の微生物。

【請求項11】 誘導物質無しで有機化合物を分解することのできるコリネバクテリウム・スピーシズJM1 (FERM BP-5352)。

【請求項12】 オキシゲナーゼを構成的に発現しない微生物に変異源を用いた変異誘発処理を施して得られた、オキシゲナーゼを構成的に発現している微生物を用いて有機化合物を分解せしめることを特徴とする有機化合物の生分解方法。

【請求項13】 該汚染物質が芳香族化合物である請求項12の環境修復方法。

【請求項14】 該芳香族化合物がフェノール、トルエン及びクレゾールの少なくとも一つである請求項13の環境修復方法。

【請求項15】 該汚染物質が塩素化脂肪族炭化水素化

合物である請求項12の環境修復方法。

【請求項16】 該塩素化合物がトリクロロエチレン及びジクロロエチレンの少なくとも一つである請求項15の環境修復方法。

【請求項17】 該微生物に該汚染物質を含有する媒体を接触させて該汚染物質を分解させる請求項12の環境修復方法。

【請求項18】 該微生物が担体に担持され、該担体に該媒体を接触させる請求項17の環境修復方法。

10 【請求項19】 該微生物を担持する担体を有する容器の一端から該媒体を導入し他端から排出する請求項17の環境修復方法。

【請求項20】 該媒体が水性媒体である請求項17の環境修復方法。

【請求項21】 該媒体が土壌である請求項17の環境修復方法。

【請求項22】 該微生物を含む液体を汚染物質で汚染された土壌中に導入する請求項17の環境修復方法。

20 【請求項23】 該微生物を含む液体を該土壌中に導入すると共に該微生物の増殖を促す物質を該土壌中に導入して、該微生物を該土壌中で増殖せしめる請求項22の環境修復方法。

【請求項24】 該物質が該微生物にとっての栄養素である請求項23の環境修復方法。

【請求項25】 該物質が酸素である請求項23の環境修復方法。

【請求項26】 該微生物の土壌中への導入を、該土壌に設けた井戸 (well) から圧力を加えて行う請求項22の環境修復方法。

30 【請求項27】 該微生物を含む液相中に汚染物質で汚染された土壌を導入する請求項17の環境修復方法。

【請求項28】 該媒体が気体である請求項17の環境修復方法。

【請求項29】 該微生物を含む液相中に汚染物質で汚染された気体を導入する請求項17の環境修復方法。

40 【請求項30】 オキシゲナーゼを構成的に発現していない化合物に、変異源を用いた変異誘発処理を施して得られたオキシゲナーゼを構成的に発現している微生物を用いて環境中の汚染物質を分解させる工程を有する環境修復方法。

【請求項31】 該汚染物質が芳香族化合物である請求項30の環境修復方法。

【請求項32】 該芳香族化合物がフェノール、トルエン及びクレゾールの少なくとも一つである請求項31の環境修復方法。

【請求項33】 該汚染物質が塩素化脂肪族炭化水素化合物である請求項30の環境修復方法。

50 【請求項34】 該塩素化合物がトリクロロエチレン及びジクロロエチレンの少なくとも一つである請求項33の環境修復方法。

【請求項35】 該微生物に該汚染物質を含有する媒体を接触させて該汚染物質を分解させる請求項30の環境修復方法。

【請求項36】 該微生物が担体に担持され、該担体に該媒体を接触させる請求項35の環境修復方法。

【請求項37】 該微生物を担持する担体を有する容器の一端から該媒体を導入し他端から排出する請求項35の環境修復方法。

【請求項38】 該媒体が水性媒体である請求項35の環境修復方法。

【請求項39】 該媒体が土壌である請求項35の環境修復方法。

【請求項40】 該微生物を含む液体を汚染物質で汚染された土壌中に導入する請求項35の環境修復方法。

【請求項41】 該微生物を含む液体を該土壌中に導入すると共に該微生物の増殖を促す物質を該土壌中に導入して、該微生物を該土壌中で増殖せしめる請求項40の環境修復方法。

【請求項42】 該物質が該微生物にとっての栄養素である請求項41の環境修復方法。

【請求項43】 該物質が酸素である請求項41の環境修復方法。

【請求項44】 該微生物の土壌中への導入を、該土壌に設けた井戸 (well) から圧力を加えて行う請求項40の環境修復方法。

【請求項45】 該微生物を含む液相中に汚染物質で汚染された土壌を導入する請求項35の環境修復方法。

【請求項46】 該媒体が気体である請求項35の環境修復方法。

【請求項47】 該微生物を含む液相中に汚染物質で汚染された気体を導入する請求項35の環境修復方法。

【請求項48】 オキシゲナーゼを構成的に発現している第1の微生物とオキシゲナーゼを誘導的に発現する能力を有する第2の微生物とが共存し、且つ該第2の微生物にオキシゲナーゼを発現させることのできる誘導物質を含む環境から前記オキシゲナーゼを構成的に発現している微生物を選択的に取得する方法であって、前記オキシゲナーゼを構成的に発現している微生物及び前記オキシゲナーゼを誘導的に発現する能力を有する微生物の混合物を用意する工程；及び該混合物を、オキシゲナーゼで酸化されることで検出可能な特性を有する酸化物を生じる、該誘導物質としても機能する前駆物質を含む培地上で該微生物を増殖させてコロニーを形成させると共に該微生物の増殖と該コロニーへの該酸化物の生成との間に実質的な時間差のないコロニーを分離する工程；を有することを特徴とするオキシゲナーゼを構成的に有する微生物の取得方法。

【請求項49】 オキシゲナーゼを構成的に発現している第1の微生物とオキシゲナーゼを誘導的に発現する能力を備えた第2の微生物とが共存し、且つ該第2の微生物

物にオキシゲナーゼを発現させることのできる誘導物質を含む環境から前記オキシゲナーゼを構成的に有する微生物を選択的に検出する方法であって、前記オキシゲナーゼを構成的に発現している微生物と前記オキシゲナーゼを誘導的に発現する能力を有する微生物とを含む混合物を用意する工程；オキシゲナーゼで酸化されることで検出可能な特性を有する酸化物を生じる、該誘導物質としても機能する前駆物質を含む培地上で該混合物を培養して前記微生物のコロニーを形成させたときに、前記コロニーの成長と前記コロニー内の該酸化物の生成を示す部分の発現との間に実質的な時間差の無いコロニーと時間差のあるコロニーとが生じるように前記微生物を増殖させるような栄養を含む培地を用意する工程；及び該前駆物質を添加せしめた該培地上で該混合物を培養せしめて前記微生物のコロニーを形成させて、該コロニーの成長と該コロニーへの該酸化物の生成との間に実質的な時間差の無いコロニーを検出する工程；を有することを特徴とするオキシゲナーゼを本来的に有している微生物の検出方法。

【請求項50】 前記混合物の培養工程に先立って、前記オキシゲナーゼを誘導的に発現する能力を備えた微生物にオキシゲナーゼを発現させる誘導物質を含まない培地上で該混合物を培養せしめる工程を有する請求項49の微生物の検出方法。

【請求項51】 該前駆物質がオキシゲナーゼの酸化によって呈色性酸化物を生じる物である請求項49の微生物の検出方法。

【請求項52】 該前駆物質がインドールである請求項51の微生物の検出方法。

【請求項53】 該前駆物質がクレオソートである請求項51の微生物の検出方法。

【請求項54】 該前駆物質が $\alpha$ -アミノフェノールである請求項51の微生物の検出方法。

【請求項55】 該前駆体がカテコール骨格を有する物質である請求項51の微生物の検出方法。

【請求項56】 該物質がカテコール、3-メチルカテコール及び3-トリフルオロカテコールから選ばれる少なくとも1つである請求項55の微生物の検出方法。

【請求項57】 該前駆体がフェノールである請求項51の微生物の検出方法。

【請求項58】 該前駆物質が3-トリフルオロメチルフェノールである請求項51の微生物の検出方法。

【請求項59】 該前駆物質がクレゾールである請求項51の微生物の検出方法。

【請求項60】 該前駆物質がオキシゲナーゼの酸化によって蛍光を呈する酸化物を生じるものである請求項49の微生物の検出方法。

【請求項61】 該前駆物質がインドールである請求項60の微生物の検出方法。

【請求項62】 該インドールの酸化物であるインドキ

シルの蛍光を検出する請求項61の微生物の検出方法。

【請求項63】 前記オキシゲナーゼを構成的に有している微生物がコリネバクテリウム・スピーズ (*Corynebacterium* sp.) に属する請求項49の微生物の検出方法。

【請求項64】 前記オキシゲナーゼを構成的に有している微生物がコリネバクテリウム・スピーズJM1株 (*Corynebacterium* sp. strain JM1) (FERM BP-5352) である請求項49の微生物の検出方法。

【請求項65】 有機化合物を分解する為の酵素を構成的に発現している第1の微生物と該酵素を誘導的に発現する能力を有する第2の微生物とが共存し、且つ第2の微生物に該酵素を発現させることのできる誘導物質を含む環境から前記第1の微生物を選択的に取得する方法であって、  
前記第1の微生物及び前記第2の微生物の混合物を用意する工程；及び該酵素の作用によって検出可能な特性を有する物質を生じる、該誘導物質でもある前駆物質を含む培地上で該混合物を培養して微生物を増殖させ、該微生物の増殖と該酸化物の生成との間に実質的な時間差のない微生物を分離する工程；を有することを特徴とする有機化合物を分解する能力を本来的に有している微生物の取得方法。

【請求項66】 有機化合物を分解可能な酵素を構成的に発現している第1の微生物と該酵素を誘導的に発現する能力を備えた第2の微生物とが共存し、該第2の微生物に該酵素を発現させることのできる誘導物質を含む環境から該第1の微生物を選択的に検出する方法であって、

前記第1の微生物と前記第2の微生物とを含む混合物を用意する工程；該酵素の作用によって検出可能な特性を有する物質を生じる、該誘導物質でもある前駆物質を含む培地上で該混合物を培養したときに、微生物の成長と該酸化物の生成を示す部分の発現との間に実質的な時間差の無い微生物と時間差のある微生物とが生じるように前記微生物を増殖させるような栄養を含む培地を用意する工程；及び該前駆物質を添加せしめた該培地上で該混合物を培養せしめて、該微生物の成長と該酸化物の生成との間に実質的な時間差の無い微生物を検出する工程；を有することを特徴とする有機化合物を分解可能な酵素を本来的に有している微生物の検出方法。

【請求項67】 該有機化合物が芳香族化合物である請求項66の検出方法。

【請求項68】 該芳香族化合物がフェノール、トルエン及びクレゾールの少なくとも一つである請求項67の検出方法。

【請求項69】 該有機化合物が塩素化脂肪族化合物である請求項66の検出方法。

【請求項70】 該塩素化脂肪族化合物がトリクロロエ

チレン及びジクロロエチレンである請求項69の検出方法。

【請求項71】 該酵素がオキシゲナーゼである請求項66の検出方法。

【請求項72】 該前駆物質は該酵素の作用によって該微生物のコロニー内に着色部分を形成する物質を生じさせるものである請求項66の検出方法。

【請求項73】 該前駆物質がインドールである請求項72の検出方法。

10 【請求項74】 該前駆物質は該酵素の作用によって蛍光を生じさせる物質をもたらすものである請求項66の検出方法。

【請求項75】 該前駆物質の酵素で処理された物質の生成を微生物の蛍光の測定によって確認する請求項74の検出方法。

【請求項76】 該蛍光をフローサイトメータ (FCM) で検出する請求項75の検出方法。

【請求項77】 該蛍光を蛍光顕微鏡で検出する請求項75の検出方法。

20 【請求項78】 オキシゲナーゼを構成的に発現している微生物とオキシゲナーゼを誘導的に発現する能力を備えた微生物とが共存している環境からの前記オキシゲナーゼを構成的に有する微生物の検出の為のキットであって、

オキシゲナーゼによる酸化によって呈色される呈色物質を含む培地上で前記オキシゲナーゼを構成的に発現している微生物と前記オキシゲナーゼを誘導的に発現する能力を有する微生物とを含む混合物を培養して前記微生物のコロニーを形成させたときに、前記コロニーの成長と前記コロニーへの該呈色物質の生成による変色部分の発現との間に実質的な時間差の無いコロニーと時間差のあるコロニーとが生じるように前記微生物を増殖させるような栄養を含む培地；及び該呈色物質を備えたことを特徴とするオキシゲナーゼを本来的に有している微生物の検出キット。

【請求項79】 請求項65に記載の方法により取得された微生物を用いて有機化合物を分解することを特徴とする微生物を用いた有機化合物の分解方法。

【請求項80】 該有機化合物が芳香族化合物である請求項79の分解方法。

【請求項81】 該芳香族化合物がフェノール、トルエン及びクレゾールの少なくとも一つである請求項80の分解方法。

【請求項82】 該有機化合物が塩素化脂肪族化合物である請求項79の分解方法。

【請求項83】 該塩素化脂肪族化合物がトリクロロエチレン及びジクロロエチレンの少なくとも一方である請求項82の分解方法。

【請求項84】 汚染物質で汚染された環境を微生物を用いて修復する方法において、請求項65に記載の方法

で取得した微生物を用いて該汚染物質を分解せしめる工程を有することを特徴とする環境修復方法。

【請求項85】 該環境が土壌、水または気体である請求項84の環境修復方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は有機化合物を分解可能な新規微生物、それを用いた有機化合物の分解方法及びそれを用いた環境修復方法に関する。

【0002】 また本発明はオキシゲナーゼを構成的に有する微生物の取得方法、及びそれによって取得された微生物を用いた環境修復方法に関する。

【0003】 更に本発明はオキシゲナーゼを構成的に有する微生物の検出方法に関する。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 近年、生体に対し有害でかつ難分解性である有機塩素化合物による環境汚染が大きな問題となってきた。特に、国内外の紙・パルプ工業や半導体製造工場内等の土壌中にはテトラクロロエチレン (PCE) やトリクロロエチレン (TCE)、ジクロロエチレン (DCE) 等の有機塩素化合物による汚染がかなりの範囲で拡がっていると考えられており、実際に環境調査等で検出された事例が多数報告されている。

【0005】 これらの有機塩素化合物は土壌中に残留したものが雨水等により、地下水中に溶解して周辺地域一帯に拡がるとされている。このような化合物は発癌性の疑いがあり、また環境中で非常に安定であるため、特に飲料水の水源として利用されている地下水の汚染は大きな社会問題とされている。

【0006】 このようなことから、有機塩素化合物の除去、分解による、汚染地下水等の水性媒体や土壌およびそれに伴う周辺の気相の浄化は、環境保全の観点から重要な課題であり、浄化に必要な技術の開発が行われてきている。

【0007】 このような有機塩素化合物に対する浄化処理方法として近年微生物による分解が報告され、その実用化に向けた研究がなされ始めている。即ち、微生物を用いた生物分解処理では、用いる微生物を選択することで有機塩素化合物を無害な物質までに分解できること、基本的には特別な薬品が不要であること、メンテナンスにかかる労力やコストを軽減できること等の利点がある。

【0008】 例えば、TCE分解菌としては、*Welchia alkenophila* sero 5 (USP 4877736, ATCC 53570)、*Welchia alkenophila* sero 33 (USP 4877736, ATCC 53571)、*Methylocystis* sp. strain M (Agric. Biol. Chem., 53,2903(1989)、*Biosci. Biotech. Biochem.*, 56,486(1992)、同56,736(1992))、*Methylosinus trichosporium* OB3b (Am. Chem. Soc. Natl. Meet. Dev. Environ. Microbiol., 29,365(1989)、*Appl. Environ. Microbio*

l., 55,3155(1989)、*Appl. Biochem. Biotechnol.*, 28,877(1991)、特開平02-92274号公報、特開平03-292970号公報)、*Methylomonas* sp. MM2 (*Appl. Environ. Microbiol.*, 57,236(1991))、*Alcaligenes denitrificans* ssp. *xylosoxidans* JE75 (*Arch. microbiol.*, 154,410(1990))、*Alcaligenes eutrophus* JMP134 (*Appl. Environ. Microbiol.*, 56,1179(1990))、*Mycobacterium vaccae* JOB5 (*J. Gen. Microbiol.*, 82,163(1974)、*Appl. Environ. Microbiol.*, 54,2960(1989)、ATCC 29678)、*Pseudomonas putida* BH(下水道協会誌, 24,27(1987))、*Acinetobacter* sp. strain G4 (*Appl. Environ. Microbiol.*, 52,383(1986)、同53,949(1987)、同54,951(1989)、同56,279(1990)、同57,193(1991)、USP 4925802, ATCC 53617、この菌は初め*Pseudomonas cepacia* と分類されていたが、*Acinetobacter* sp. に変更された)、*Pseudomonas mendocina* KR-1 (*Bio/Technol.*, 7,282(1989))、*Pseudomonas putida* F1 (*Appl. Environ. Microbiol.*, 54,1703(1988)、同54,2578(1988))、*Pseudomonas fluorescens* PFL12 (*Appl. Environ. Microbiol.*, 54,2578(1988))、*Pseudomonas putida* KWI-9 (特開平06-70753号公報)、*Pseudomonas cepacia* KK01 (特開平06-227769号公報)、*Nitrosomonas europaea* (*Appl. Environ. Microbiol.*, 56,1169(1990))、*Lactobacillus fructivorans* RE (*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30,313(1980)、*J. Appl. Bacteriol.*, 34,541(1971))、*Lactobacillus vaginalis* sp. nov (*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39,368(1989)、ATCC 49540) 等を挙げることができる。

【0009】 しかしこれらの菌は全てTCE分解能を発現させる為に誘導物質として例えば芳香族化合物やメタン等の化学物質を必要とする。

【0010】 例えば上記の微生物を用いてTCEの分解を行なうときにフェノールやトルエンといった芳香族化合物は非常に有効な誘導物質であるが、その化合物自体が環境汚染物質であり、環境中に放出する際には煩雑な操作とモニタリングが必要となる。また、メタンも有効な誘導物質であるが、可燃性の気体であり、環境中に導入して制御することは危険と困難を伴う。また、誘導物質と分解対象物質との間に競合関係が生じるため、分解の効率が悪いことも問題である。又この問題は塩素化芳香族化合物、例えばPCPやPCBを微生物分解する場合も同様に生じるものである。PCP分解に対するフェノール、PCB分解に対するビフェニルも同様である。

【0011】 これらの問題を解決するため、ネルソンらは有機塩素化合物の分解誘導物質としてアミノ酸の一種であるトリプトファンを用いる方法を開発した (特開平4-502277号)。

【0012】 しかしトリプトファンは非常に高価な物質である。またこの方法によればその誘導物質固有の問題である毒性及び危険性はある程度回避されるが特定の物質を環境中に導入し、その後それを制御していくという

煩雑さは何ら解決されていない。

【0013】さらに言えば、このような誘導物質によって発現させられている、オキシゲナーゼ等のTCE分解酵素の酵素活性は通常数時間から一日程度しか維持されず、その後はまた誘導物質が必要となり、かつTCE分解が誘導物質の存在により拮抗阻害を起こすという問題も抱えている。

【0014】そこでこのようなTCE分解酵素であるオキシゲナーゼをコードする遺伝子領域を含むDNA断片を組み込んだプラスミドを宿主細菌に導入し、無害な誘導物質により、或いは誘導物質が存在しない状況でも構成的にTCE分解活性を発現させようとする試みがなされている。DNA断片の由来となる菌株としてはシュードモナスメンドシナKR-1（特開平2-503866）、シュードモナスブチダKWI-9（特開平6-105691）及びシュードモナスブチダBH（地下水・土壤汚染とその防止対策に関する研究集会第3回講演集、213（1994））が挙げられる。

【0015】しかしこれらの組み換え菌株は、誘導物質として非常に高価な物質であるIPTG（イソプロピルチオガラクトピラノシド）が必要であったり、プラスミドの宿主菌株に対する安定性が充分でない等の様々な問題を伴う。その上、組み換え菌株を環境中に放出することがパブリック・アクセプタンスの上からも規制は免れない。

【0016】又、別の試みとしてシールズ等はアシネトバクター・スピーズG4株（ATCCへの寄託に於てシュードモナス・セパシアG4株からアシネトバクター・スピーズG4株に変更された）をトランスポゾンを用いた手段で変異させて誘導物質を必要としない、TCE分解に必要なオキシゲナーゼを本来的に有している菌株を取得した（Appl. Environ. Microbiol., 58, 3977（1992）, WO92/19738号）。

【0017】しかしG4株の変異株に関しては、TCE分解活性として十分でなく、又トランスポゾンを用いているためその安定性に問題を含んでいる。また、トランスポゾン自体がカナマイシン等の耐性遺伝子を含んでいるため、環境中に放出した場合、他の菌への水平伝達による悪影響も考えられる。

【0018】上記した様に従来、誘導物質を必要としない微生物は、その取得の為に熟練した技術者及び高価な設備が必要であり、又汚染物質の分解能力も十分でなかった。

【0019】

【課題を解決するための手段】本発明は、誘導物質を用いることなく有機化合物を効率よく分解することができる新規微生物を提供することを目的とするものである。

【0020】また本発明は、誘導物質無しで有機化合物の分解能を有し、且つ容易に取得できる新規微生物を用

いて有機化合物を分解する方法、及びその微生物を用いた環境修復方法を提供することを他の目的とする。

【0021】また本発明は誘導物質無しで有機化合物の分解能を有する微生物の取得方法を提供することを他の目的とする。

【0022】また本発明は誘導物質無しで有機化合物の分解能を示す微生物の検出方法を提供することを他の目的とする。

【0023】

10 【発明の実施の形態】本発明の1実施態様によれば、誘導物質無しで有機化合物を分解することのできるコリネバクテリウム・スピーズJM1（FERM BP-5352）が得られる。

【0024】本発明の他の1実施態様によれば、オキシゲナーゼを構成的に有しない微生物に変異源を用いた変異誘発処理を施して得られた、オキシゲナーゼを構成的に有する微生物を用いて有機化合物を分解せしめることを特徴とする有機化合物の生分解方法が得られる。

20 【0025】本発明の1実施態様によれば、オキシゲナーゼを構成的に有しない化合物に、変異源を用いた変異誘発処理を施して得られたオキシゲナーゼを構成的に有する微生物を用いて環境中の汚染物質を分解させる工程を有することを特徴とする環境修復方法が得られる。

30 【0026】本発明の実施態様によれば、オキシゲナーゼを構成的に発現している第1の微生物とオキシゲナーゼを誘導的に発現する能力を有する第2の微生物とが共存し、且つ該第2の微生物にオキシゲナーゼを発現させることのできる誘導物質を含む環境から前記オキシゲナーゼを構成的に発現している微生物を選択的に取得する方法であって、前記オキシゲナーゼを構成的に発現している微生物及び前記オキシゲナーゼを誘導的に発現する能力を有する微生物の混合物を用意する工程；及び該混合物を、オキシゲナーゼで酸化されることで検出可能な特性を有する酸化物を生じる、該誘導物質としても機能する前駆物質を含む培地上で該微生物を増殖させてコロニーを形成させると共に該微生物の増殖と該コロニーへの該酸化物の生成との間に実質的な時間差のないコロニーを分離する工程；を有することを特徴とするオキシゲナーゼを構成的に発現している微生物の取得方法が得られる。

40 【0027】本発明の1実施態様によれば、オキシゲナーゼを構成的に発現している第1の微生物とオキシゲナーゼを誘導的に発現する能力を備えた第2の微生物とが共存し、且つ該第2の微生物にオキシゲナーゼを発現させることのできる誘導物質を含む環境から前記オキシゲナーゼを構成的に発現している微生物を選択的に検出する方法であって、前記オキシゲナーゼを構成的に発現している微生物と前記オキシゲナーゼを誘導的に発現する能力を有する微生物とを含む混合物を用意する工程；オキシゲナーゼで酸化されることで検出可能な特性を有す



る酸化物を生じる、該誘導物質としても機能する前駆物質を含む培地上で該混合物を培養して前記微生物のコロニーを形成させたときに、前記コロニーの成長と前記コロニー内の該酸化物の生成を示す部分の発現との間に実質的な時間差の無いコロニーと時間差のあるコロニーとが生じるように前記微生物を増殖させるような栄養を含む培地を用意する工程；及び該前駆物質を添加せしめた該培地上で該混合物を培養せしめて前記微生物のコロニーを形成させて、該コロニーの成長と該コロニーへの該酸化物の生成との間に実質的な時間差の無いコロニーを検出する工程；を有することを特徴とするオキシゲナーゼを本来的に有している微生物の検出方法が得られる。

【0028】本発明の1実施態様によれば、有機化合物を分解する為の酵素を構成的に発現している第1の微生物と該酵素を誘導的に発現する能力を有する第2の微生物とが共存し、且つ第2の微生物に該酵素を発現させることのできる誘導物質を含む環境から前記第1の微生物を選択的に取得する方法であって、前記第1の微生物及び前記第2の微生物の混合物を用意する工程；及び該酵素の作用によって検出可能な特性を有する物質を生じる、該誘導物質でもある前駆物質を含む培地上で該混合物を培養して微生物を増殖させ、該微生物の増殖と該酸化物の生成との間に実質的な時間差のない微生物を分離する工程；を有することを特徴とする有機化合物を分解する能力を本来的に有している微生物の取得方法が得られる。

【0029】本発明の1実施態様によれば、有機化合物を分解可能な酵素を構成的に発現している第1の微生物と該酵素を誘導的に発現する能力を備えた第2の微生物とが共存し、該第2の微生物に該酵素を発現させることのできる誘導物質を含む環境から該第1の微生物を選択的に検出する方法であって、前記第1の微生物と前記第2の微生物とを含む混合物を用意する工程；該酵素の作用によって検出可能な特性を有する物質を生じる、該誘導物質でもある前駆物質を含む培地上で該混合物を培養したときに、微生物の成長と該酸化物の生成を示す部分の発現との間に実質的な時間差の無い微生物と時間差のある微生物とが生じるように前記微生物を増殖させるような栄養を含む培地を用意する工程；及び該前駆物質を添加せしめた該培地上で該混合物を培養せしめて、該微生物の成長と該酸化物の生成との間に実質的な時間差の無い微生物を検出する工程；を有することを特徴とする有機化合物を分解可能な酵素を本来的に有している微生物の検出方法が得られる。

【0030】本発明の1実施態様によれば、オキシゲナーゼを構成的に発現している微生物とオキシゲナーゼを誘導的に発現する能力を備えた微生物とが共存している環境からの前記オキシゲナーゼを構成的に有する微生物の検出の為のキットであって、オキシゲナーゼによる酸化によって呈色される呈色物質を含む培地上で前記オキ

シゲナーゼを構成的に有する微生物と前記オキシゲナーゼを誘導的に発現する能力を有する微生物とを含む混合物を培養して前記微生物のコロニーを形成させたときに、前記コロニーの成長と前記コロニーへの該呈色物質の生成による変色部分の発現との間に実質的な時間差の無いコロニーと時間差のあるコロニーとが生じるように前記微生物を増殖させるような栄養を含む培地；及び該呈色物質を備えたことを特徴とするオキシゲナーゼを本来的に有している微生物の検出キットが得られる。

10 【0031】本発明の1実施態様によれば、請求項65に記載の方法により取得された微生物を用いて有機化合物を分解することを特徴とする微生物を用いた有機化合物の分解方法が得られる。

【0032】本発明の1実施態様によれば、汚染物質で汚染された環境を微生物を用いて修復する方法において、請求項65に記載の方法で取得した微生物を用いて該汚染物質を分解せしめる工程を有することを特徴とする環境修復方法が得られる。

20 【0033】なお本発明に於て「微生物の増殖と前駆物質の酸化物の発現との間に実質的に時間差が無い」とは、微生物を検出する為の公知の手段で微生物の存在が検出できるようになった時点で該酸化物の存在が確認できれば「時間差が無い」ものとする。

【0034】さらにまた本発明において「構成的にオキシゲナーゼを発現している微生物」とは、例えば特定の有機化合物を微生物のオキシゲナーゼによって分解させるにあたって、該微生物にオキシゲナーゼを発現させる為の他の有機化合物との接触が不要な微生物のことを指すものである。

30 【0035】また「構成的に有機化合物を分解可能な酵素を発現している微生物」とは、例えば特定の有機化合物を微生物の酵素の作用を用いて分解させるにあたって、該微生物に該酵素を発現させる為の他の有機化合物との接触が不要な微生物のことを指すものである。

【0036】本発明者らは芳香族化合物（フェノール、トルエン、クレゾール等）や塩素化脂肪族炭化水素化合物を誘導物質を用いることで分解できる特定の微生物（ブタベスト条約に基づく国際寄託の番号：FERM BP-5102/識別の為の表示：コリネバクテリウム・スピーシズJ1株（*Corynebacterium* sp. J1）（以下「J1株」と称す。））を変異源を用いた変異操作によって変異させ分解対象の化学物質以外の化合物、例えば従来から誘導物質として知られている化合物と接触させることなしに分解対象である化学物質を分解する能力を有する変異株を取得した。

40 【0037】なお上記菌株FERM BP-5102は、当初本菌株がコリネバクテリウム属に属しているものとして「コリネバクテリウム・スピーシズJ1株」と表示したが、後の検討により本菌株が「コリネバクテリウム属には属さない」と認められたため、FERM B

P-5102の識別のための表示を「J1株」と変更した。

【0038】又この変異株を、例えば芳香族化合物や塩素化脂肪族有機塩素化合物で汚染された環境（例えば水性媒体、土壌或いは気相）と接触させて汚染物質を分解せしめて環境を修復する方法を見いだした。

【0039】先ず上記の変異株の由来株であるJ1株の菌学的性質を以下に示す。

【0040】グラム染色性及び形態：グラム陰性桿菌

各培地における生育

BHIA：生育良好

MacConkey：生育可能

コロニーの色：クリーム色

至適温度：25℃＞30℃＞35℃

運動性：陰性（半流動培地）

TSI (slant/butt)：アルカリ/アルカリ、H<sub>2</sub>S(-)

オキシダーゼ：陽性（弱）

カタラーゼ：陽性

糖の発酵

グルコース：陰性

シュクロース：陰性

ラフィノース：陰性

ガラクトース：陰性

マルトース：陰性

ウレアーゼ：陽性

エスクリン加水分解（β-グルコシダーゼ）：陽性

硝酸還元：陰性

インドール産生：陰性

グルコース酸性化：陰性

アルギニンジヒドロラーゼ：陰性

ゼラチン加水分解（プロテアーゼ）：陰性

β-ガラクトシダーゼ：陰性

各化合物の同化

グルコース：陰性

L-アラビノース：陰性

D-マンノース：陰性

D-マンニトール：陰性

N-アセチル-D-グルコサミン：陰性

マルトース：陰性

グルコン酸カリウム：陰性

n-カプリン酸：陽性

アジピン酸：陰性

d1-リンゴ酸：陽性

クエン酸ナトリウム：陽性

酢酸フェニル：陰性

J1株は芳香族化合物資化性の有機塩素化合物分解菌であり、分解にはオキシゲナーゼが関与している。そして、土壌等の自然環境における温度に近い15℃という低温においても、20ppm前後のTCEをほぼ完全に

分解するといった卓越した有機塩素化合物分解能を有しているが、分解誘導物質としてフェノールやトルエン、クレゾールといった芳香族化合物が必要である。

【0041】これに対し、本発明で用いる変異株の菌学的性質は、上記したJ1株の菌学的性質と同一であるが分解誘導物質としてのフェノールやトルエン、クレゾールといった芳香族化合物が無い状態で有機塩素化合物を分解する能力を有している。そこで、本菌株を新菌株であると認定し、通産省生命工学工業技術研究所に寄託した（受託番号：FERM BP-5352）（なお本菌株は以降「JM1株」と称する）。

【0042】なお上記菌株FERM BP-5352についても、当初本菌株がコリネバクテリウム属に属しているものとして「コリネバクテリウム・スピーズJM1株」と表示したが、“コリネバクテリウム属には属さない”と認められたため、FERM BP-5352の識別のための表示を「JM1株」と変更した。

【0043】前述したことからわかるように、JM1株は有機塩素化合物とならんでフェノールやクレゾールといった芳香族化合物も分解し、必然的にこれらの化合物に対する耐性を持ち合わせている。このような化合物は通常殺菌剤として用いられていることからわかるように、多くの微生物にとって有害であり、しかも実際に廃液の成分として混入している場合も多い。しかしJM1株はこれらの化合物が混入していても、死滅や活性阻害等の障害を受けることなく有機塩素化合物の分解処理を実現することが可能である。

【0044】また、地下水や土壌といった環境中の有機塩素化合物を分解する際に、フェノール等の誘導物質を必要としないから、通常の栄養素のみを導入すればよく、操作が簡便となる。また毒性や危険性の高い誘導物質を環境中に放出しなければならないという問題から解放される。

【0045】さらに、例えば塩素化脂肪族炭化水素化合物を微生物を用いて分解する場合、該微生物がオキシゲナーゼを誘導的に分解する微生物であるとフェノール等の誘導物質を添加する必要があり、そしてオキシゲナーゼが誘導的に発現した該微生物は誘導物質と塩素化脂肪族炭化水素化合物の両方を分解することになるが塩素化脂肪族炭化水素化合物の分解効率は著しく低下してしまう（拮抗阻害）。

【0046】これに対してオキシゲナーゼを構成的に有している微生物は誘導物質が不要なため本来の分解対象物である脂肪族有機塩素化合物を効率的に分解することができる。

【0047】本発明のJM1株を培養するために用いられる培地の栄養源としては、通常の微生物の生育に必要なとされるもので本菌が資化可能な栄養源であればいかなる炭素源、窒素源及び無機塩類等でもよく、例えばM9培地に若干の栄養源として酵母エキス等を添加したもの

で培養することが可能である。

【0048】以下にM9培地の組成を示す。

【0049】

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  : 6.2g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 3.0g

$\text{NaCl}$  : 0.5g

$\text{NH}_4\text{Cl}$  : 1.0g (培地11中; pH 7.0)

培養は好気条件下で行うことができ、液体培養でも固体培養でもよい。培養温度は30℃前後が望ましい。

【0050】次に上記変異株J1株を取得する方法を以下に説明する。

【0051】前記したようにJ1株を変異源を用いた変異誘発処理を施すという一般的な変異処理によりJ1株を取得することができる。

【0052】変異源としては物理的変異源や化学的変異源として公知の物を用いることができ、具体的には物理的変異源として紫外線、化学的変異源としてエチルメタンスルホネート、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、亜硝酸やアクリジン色素等が挙げられる。

【0053】そしてこのような変異源の使用による一般的な変異処理によってオキシゲナーゼを構成的に有する微生物は、従来の遺伝子組み替え技術を用いてオキシゲナーゼを構成的に有する微生物を形成する場合と比較して極めて容易に取得でき、また微生物による環境修復に利用する場合にも遺伝子組み替え体と比較して適用範囲が広く好ましい物である。

【0054】ところで本願出願人らは上記J1株からのJ1株の取得にあたり、従来全く認識されてこなかった技術的知見を得た。

【0055】それはオキシゲナーゼを誘導的に発現可能な菌株であるJ1株とオキシゲナーゼを構成的に発現している菌株であるJ1株とが共存している環境からのJ1株の選択的な取得に関する物である。

【0056】即ち、従来知られている誘導物質を必要としないトリクロロエチレン分解菌はオキシゲナーゼの酸化作用によって呈色性酸化物を生じる様な化合物（以下「前駆物質」と称する）を添加した培地で培養し、呈色したコロニーを取り出すことで釣菌されている。

【0057】具体的にいえば、上記のG4株の変異株の場合3-トリフルオロメチルカテコール(TFMC)の酸化生成物である7,7,7-トリフルオロ-2-ヒドロキシ-6-オキソ-2,4-ヘプタジエノイック酸(TFHA)が黄色に呈色することを利用して釣菌されており、また上記KWI-9株の遺伝子組み替え体ではインドールの酸化生成物であるインジゴが青色を呈することを利用している。なお、芳香族化合物オキシゲナーゼのこのような性質を利用して、インドールからインジゴの生産を工業的に行う方法も開発されている（日本特

許公開平成6年261776号、日本特許公開平成6年261777号、日本特許公開平成6年261778号)。

【0058】ところが本発明者らの検討の結果、上記の物質を含む前駆物質として用い得る公知の物質でオキシゲナーゼを誘導的に発現する微生物にとっての誘導物質として機能しないものを見出すことができなかった。

【0059】この事はオキシゲナーゼを構成的に有する微生物、例えばJ1株とオキシゲナーゼを誘導的に発現する微生物、例えばJ1株とが共存する環境からオキシゲナーゼを構成的に有する微生物を選択的に取得する場合に問題となる。

【0060】そしてこの事は従来のオキシゲナーゼを構成的に発現している微生物の場合、その取得時の培養工程でオキシゲナーゼを誘導的に発現する微生物と共存する状況は生じない為に技術課題としては認識されてこなかった物と考えられる。

【0061】したがって前駆体の酸化物の呈色を利用して、オキシゲナーゼを誘導的に発現する微生物とオキシゲナーゼを構成的に発現している微生物とが共存している環境からオキシゲナーゼを構成的に発現している微生物を選択的に効率よく取得する方法に関してはこれまで何らの指針も示されてこなかった。

【0062】そこで本発明者らはこの知見に対して種々検討を行った結果、オキシゲナーゼを構成的に発現している微生物の成長と呈色部分の発現との時間差とオキシゲナーゼを誘導的に発現する微生物の成長と呈色部分の発現との時間差との間に有意な差異を持たせることができること、そしてそれを利用してオキシゲナーゼを構成的に有する微生物を選択的にピックアップできることを見出した。

【0063】具体的な方法で説明すると、例えば、寒天プレート上でのインドールからインジゴへの酸化による青色の呈色の場合、誘導的にオキシゲナーゼを発現する微生物の場合は、ある程度コロニーを形成した後に中心部より呈色が起こり、徐々にコロニー全体へと広がっていく。これに対し、構成的にオキシゲナーゼを発現している微生物の場合はコロニーの形成に伴って同時に呈色が見られる。そこで、ある期間、すなわち構成的にオキシゲナーゼを発現している微生物のみの呈色が現れている期間を区切ってコロニーの呈色を確認することによって構成的にオキシゲナーゼを発現している微生物のみを効率的に取得することができる。

【0064】より具体的には例えばJ1株及びJ1株とを、前駆体としてインドール及び栄養として酵母エキス0.1%を含むM9寒天培地上で30℃で培養したところ1日経過後にJ1株及びJ1株は共に直径約1~2mm程度のコロニーに成長した。そしてJ1株のコロニーの方はインドールの酸化物であるインジゴの青色に呈色した部分がコロニー全体に広がっているのに対

し、J1株のコロニーについてはインジゴの呈色部分は目視では観察できなかった。更に培養開始から2〜3日後には双方の微生物のコロニーは直径約5mmとなり、JM1株のコロニーの方はインドールの酸化物であるインジゴの青色に呈色した部分がコロニー全体に広がっているのに対し、J1株のコロニーについてはコロニー中心部分に直径約1〜2mmのインジゴの呈色部分が観察された。

【0065】この結果から微生物の成長と前駆物質の酸化物の発現との時間差のないコロニーをピックアップすることでJM1株を選択的に取得することができる。

【0066】上記のオキシゲナーゼを構成的に発現している微生物の選択的な取得方法に於て前駆物質としては、オキシゲナーゼによって呈色性の酸化物を生じるもの他に蛍光を生じるような酸化物を与える前駆物質を用いることもできる。

【0067】前駆物質として例えば目視で検知しうような呈色性の酸化物を生じるものを用いる場合、オキシゲナーゼを構成的に発現している微生物の選択的な取得の為の酸化物の生成は、上記の通り、固体培地（例えば寒天培地等）上のコロニーに生じる変色部分の発現によって確認できる。

【0068】また前駆物質として蛍光を生じる酸化物を与えるものを用いる場合、液体培養において培地中に該前駆物質を含有させ、微生物が該前駆物質を取り込み、オキシゲナーゼの酸化によって生ずる酸化物による菌体の呈色（蛍光）を、フローサイトメーター（FCM）や蛍光顕微鏡等の細胞検出手段にて検出及び単離することが可能である。この場合はコロニー形成のような菌体の増殖期間を省略することが可能であり、より効率の高い取得方法となる。具体的な例としては、インドールがオキシゲナーゼによって酸化され、インジゴとなる中間生成物であるインドキシルが、緑色蛍光を発することを利用することが可能である。

【0069】また前記オキシゲナーゼを構成的に発現している微生物の選択的な取得方法に用いる前駆物質は、検出対象の微生物が有するオキシゲナーゼの種類に応じて選択することが好ましい。

【0070】例えば上記のJM1株は有機化合物、例えば芳香族化合物や塩素化脂肪族炭化水素を芳香族分解経路（aromatic degradative pathway）によって分解する芳香族化合物オキシゲナーゼを構成的に有していることから、前駆物質としてはインドール、クレオソート、カテコール、3-メチルカテコール、3-トリフルオロメチルカテコール、o-アミノフェノール等を用いることが好ましい。

【0071】またオキシゲナーゼがアルカン化合物オキシゲナーゼやアンモニアオキシゲナーゼである場合にはそれぞれのオキシゲナーゼに適した前駆物質を用いればよい。

【0072】ところで上記したオキシゲナーゼを構成的に有する微生物の取得方法は他の用途への適用も可能である。

【0073】例えば、構成的にオキシゲナーゼを発現している微生物の応用として、汚染物質で汚染された環境中に該微生物を投入して環境修復を行わせる事が予想される。

【0074】そして効率良く環境修復を行う上で、環境中の該微生物を継続してモニターしていくことは重要と考えられ、この場合処理環境中に存在している種々の土着微生物の中から上記の構成的にオキシゲナーゼを発現している微生物のみを区別して検出する技術が必要となってくると推定される。このときに上記の方法を応用することで該処理環境中のオキシゲナーゼを構成的に有する微生物を選択的に検出することができる。

【0075】具体的には前駆物質を含む培地上で処理環境中から取得した微生物の混合物を培養し、微生物の増殖と前駆物質の酸化物の発現との間に時間差が実質的に無い微生物を検出することで処理環境中のオキシゲナーゼを構成的に発現している微生物の存在の検出を行うことができる。

【0076】なおオキシゲナーゼを構成的に有する微生物の成長と酸化物、例えば呈色部分の発現との時間差とオキシゲナーゼを誘導的に発現する微生物の成長と酸化物、例えば呈色部分の発現との時間差との間の差異を、環境中のオキシゲナーゼを構成的に有する微生物の検出に適用する場合、該処理環境中の土着微生物が該環境中においてオキシゲナーゼを誘導的に発現している場合も考えられる為、該前駆体を含む培地での該環境中の微生物混合物の培養工程に先立って、誘導物質を含まない培地で該微生物混合物を培養してオキシゲナーゼを誘導的に発現している微生物からオキシゲナーゼを消滅させておくことが好ましい。

【0077】また上記オキシゲナーゼを構成的に発現している微生物の選択的な取得方法或はそれを用いた検出方法に於いて、培地に加える栄養としてはオキシゲナーゼを構成的に発現している微生物とオキシゲナーゼを誘導的に発現することのできる微生物とが同程度の速度で増殖できる様な栄養を用いる事が好ましい。

【0078】何故ならオキシゲナーゼを構成的に発現している微生物とオキシゲナーゼを誘導的に発現することのできる微生物との間で微生物の増殖と培地中の前駆物質の酸化物の発現との時間差の比較を容易に行うことができる為である。

【0079】例えば前記したJ1株の変異株であるJM1株をJ1株が共存している環境から取得するような場合には親株と子株の間には通常大きな増殖速度の差異があるとは考え難く栄養の選択が大きな問題となることは少ないと考えられる。

【0080】しかし処理環境中のオキシゲナーゼを構成

的に発現している微生物の検出の場合、処理環境中に存在する微生物は種々雑多であり栄養の選択が検出精度に影響を与えることがあり、処理環境中に存在するオキシゲナーゼを構成的に発現している微生物の存在を検出する方法に於いては栄養の選択はより重要である。

【0081】従って処理環境中に存在するオキシゲナーゼを構成的に発現している微生物の存在を検出する方法を実施する場合には、例えば処理に用いるオキシゲナーゼを構成的に発現している微生物の種々の栄養に対する増殖速度を調べると共に処理しようとする環境中の微生物の種々の栄養に対する増殖速度を調べ、同程度の増殖速度を得られる栄養を予め選択し、その栄養を培地に添加して上記の検出方法を実施することが好ましい。

【0082】ここで選択される培地は各処理環境に棲息している微生物によって種々異なる物と考えられ一概に決定されるものではなく、例えば酵母エキス、ペプトン、肉汁、麦芽エキス、等を含む天然培地や無機塩を含む培地に炭素源及びエネルギー源を加えた合成培地等の中から各処理環境に適応した培地を選択すればよい。

【0083】更に上記のオキシゲナーゼを構成的に発現している微生物の検出方法によって検出可能なオキシゲナーゼを構成的に発現している微生物は、前記したJ M 1株のような変異源を用いて変異された微生物に限られず、従来のオキシゲナーゼを構成的に発現している微生物、例えばシュドモナスメンディシナK R-1の組み換え菌株等も検出可能である。

【0084】次に構成的にオキシゲナーゼを発現している微生物をもちいた有機化合物の分解処理方法及び環境修復方法について説明する。

【0085】オキシゲナーゼを構成的に発現している微生物、例えば前記した取得方法で得た微生物(J M 1等)を用いて有機化合物、例えば芳香族化合物(フェノール、トルエンやクレゾール等)や塩素化脂肪族炭化水素化合物(トリクロロエチレンやジクロロエチレン等)を分解処理する方法としては、該有機化合物を該微生物と接触させることによって行うことができる。

【0086】そして分解処理前及び分解処理中を通じて誘導物質を用いる必要が無い。

【0087】該微生物と分解されるべき有機化合物との接触は微生物が分解活性を発現し得る通常の条件であればいかなる方法でも行うことができ、バッチ法、半連続法、連続法等種々の方法を用いて実施できる。

【0088】該微生物は半固定状態で或いは適当な担体に固定化して用いることもできる。本発明にかかる、オキシゲナーゼを構成的に発現してなる微生物を汚染物質として有機化合物、例えば芳香族化合物(フェノール、トルエン、クレゾールなど)や塩素化脂肪族炭化水素化合物(トリクロロエチレン、ジクロロエチレンなど)を含む水性媒体と接触させることで該有機化合物の分解そして該水性媒体の浄化処理を行うことができる。

【0089】以下に主な利用形態を述べるが、これらの形態に限定されることなく、本菌株はいかなる水性媒体中の有機化合物汚染の浄化処理にも利用可能である。

【0090】例えば、最も簡便な方法としては、例えば芳香族化合物や有機塩素化合物によって汚染された水性媒体中に直接J M 1株を導入して行うという方法がある。この場合、水性媒体のpH、塩濃度、温度や汚染物質の濃度等を調整する必要があるが、例えばJ M 1株は極端な酸性或いはアルカリ性、高塩濃度でない限り分解活性は維持され、また前述のように20ppmという高濃度のTCEも分解する能力を有している。さらに、通常の実験室での培養温度よりも低い15℃でも遜色なく増殖し、十分に分解活性を維持し得る。

【0091】また別の利用形態としては、培養槽を設けてそこで微生物を培養し、この培養槽に汚染された水性媒体を所定の流量で導入し、分解させる形態がある。水性媒体の導入及び排出は連続して行ってもよいが、処理能力に応じて間欠的に、或いはバッチ式で処理することも可能である。このような制御を芳香族化合物及び/或いは有機塩素化合物の濃度に合わせてシステム制御し最適化を図るとよい。

【0092】さらに、微生物を担体、例えば土壌粒子等に付着させ、これを反応槽に充填し、この反応槽内に汚染された水性媒体を導入し分解処理を行う形態がある。この場合使用する担体には、土壌粒子に限らずいかなるものでも利用可能であるが、微生物の保持能力に優れ、通気性を損なわないようなものがより望ましい。例えば、微生物の棲息空間を与えるような材料として、従来より医薬品工業、食品工業、廃水処理システム等で利用されるバイオリアクタで汎用されている様々な微生物担体が利用できる。

【0093】より具体的には、多孔質ガラス、セラミックス、金属酸化物、活性炭、カオリナイト、ベントナイト、ゼオライト、シリカゲル、アルミナ、アンスラサイト等の無機粒子状担体、デンプン、寒天、キチン、キトサン、ポリビニルアルコール、アルギン酸、ポリアクリルアミド、カラギーナン、アガロース、ゼラチン等のゲル状担体、イオン交換性セルロース、イオン交換樹脂、セルロース誘導体、グルタルアルデヒド、ポリアクリル酸、ポリウレタン、ポリエステル等が挙げられる。また天然物として、綿、麻、紙類といったセルロース系のもの、木粉、樹皮といったリグニン系のものも利用可能である。

【0094】本発明における土壌中の汚染物質としての有機化合物の分解処理は、土壌中に存在する該有機化合物と微生物を接触させることによって行うことができる。以下に主な利用形態を述べるが、これらの形態に限定されることなく、本菌株は芳香族化合物及び/或いは塩素化脂肪族炭化水素化合物で汚染された土壌の様々な浄化処理にも利用可能である。

【0095】例えば、最も簡便な方法としては、汚染物質としての有機化合物、例えば芳香族化合物や有機塩素化合物によって汚染された土壤中に直接微生物を導入して行うという方法がある。導入の方法としては、土壤表面に散布して行う方法はもとより、比較的深い地層中の処理の場合には、地中に挿入した井戸から導入する方法がある。

【0096】さらに、空気や水等によって圧力をかけて行うと広範囲に微生物が広がり、より効果的である。この場合、土壤中の諸条件を処理に用いる微生物に適するように調整する必要があるが、微生物は土壤粒子等の担体の存在下で増殖がより速められ、この意味で土壤中という条件は好都合である。さらに、通常土壤中の平均温度とされている15℃でも遜色なく増殖し、十分に分解活性を維持し得る。

【0097】さらに、微生物を担体に付着させ、これを反応槽に充填し、この反応槽を汚染された土壤の、主に帯水層中に導入し分解処理を行う形態がある。

【0098】反応槽の形態はフェンス状やフィルム状のような、土壤中の広範囲を網羅できるものが望ましい。この場合使用する担体も、いかなるものでも利用可能であるが、微生物の保持能力に優れ、通気性を損なわないようなものがより望ましい。例えば、微生物の棲息空間を与えるような材料としては前記の担体として利用可能な材料と同様の材料を用いることができる。

【0099】本発明における気相中の汚染物質としての有機化合物、例えば芳香族化合物や有機塩素化合物の分解処理は、気相中に存在する汚染物質と微生物を接触させることによって行うことができる。以下に主な利用形態を述べるが、これらの形態に限定されることなく、本菌株はいかなる態様の気相中の芳香族化合物及び/或いは有機塩素化合物気相汚染の浄化処理にも利用可能である。

【0100】例えば、培養槽を設け微生物を培養し、この培養槽に汚染された気体を所定の流量で導入し、分解させる形態がある。気体の導入法については何ら制限はないが、気体の導入により培養液が攪拌されエアレーションが促進される形態がより望ましい。気体の導入及び排気は連続して行ってもよいが、処理能力に応じて間欠的に、或いはバッチ式で処理することも可能である。このような制御を有機塩素化合物の濃度に合わせてシステム制御し最適化を図るとよい。

【0101】また別の利用形態としては微生物を担体、例えば土壤粒子等に付着させ、これを反応槽に充填し、この反応槽内に汚染気体を導入し分解処理を行う形態がある。この場合使用する担体も、土壤粒子に限らずいかなるものでも利用可能であるが、微生物の保持能力に優れ、通気性を損なわないようなものがより望ましい。

【0102】例えば、微生物の棲息空間を与えるような材料としては前記した土壤処理に用いられる担体として

例示の材料と同様の材料を用いることができる。

【0103】さらに、菌の保持と栄養供給を兼用できる材料としては、農林水産業関係で利用される堆肥等にその例を多く挙げることができる。即ち、麦わら等の穀物類の藁や木鋸屑、米糠、雪花菜、砂糖黍の絞りかす等の植物由来の乾燥物、またカニやエビの殻等の海産廃棄物等が利用できる。

【0104】汚染気体の浄化には、担体になる物質をあらかじめ充填した上で菌を導入してもよいし、前培養してもかまわない。分解反応をより効率的に行わせるためには、先に述べた栄養素や含水比、酸素濃度等を所望の条件に保つとよい。また、反応槽内の担体と水分量の比は微生物の生育と通気性から、反応槽の形態は処理する気体の量、濃度等により適宜選択すればよいが、気体と担体に保持される微生物との接触が促進されるように配慮するとよい。具体的には例えば、カラム、チューブ、タンク、箱形のものを利用することができる。さらにこのような形状のものを排気ダクトやフィルタ等とユニット化してもよいし、能力に合わせていくつかを直列や並列に連続させてもよい。

【0105】汚染気体は、初め担体材料に吸着する場合もあり、微生物利用の効果が初めのうちはうまく観察されない例も稀にあるが、一定期間の後には担体材料に付着した汚染物質が分解されて、また汚染物質の分解した材料表面に再度汚染物質が吸着するというように、担体材料への吸着性は再生されと考えられ、汚染除去能は飽和することなく常に一定の分解能を維持すると推定できる。

【0106】以上のような浄化処理における微生物の増殖材料としては一般に用いられる微生物培養用の培地を使用できる。例えば、JM1株の場合、プイヨン培地、M9培地、2×YT培地、L培地、或いはポリペプトン、酵母エキス等と糖や有機酸等の炭素源を任意に混合した培地等が有効である。また、これらの培地は液状、或いはアガロースを加えることによりゲル状に調製したもの、いずれも利用可能である。

【0107】上記した環境修復方法は、閉鎖系、開放系いずれの廃液処理、土壤処理、及び空気処理方法にも適用できる。なお、微生物を担体等に固定して用いたり、生育を促進する各種の方法を併用してもよい。

【0108】以上説明した様に本発明に係る各実施態様によれば、誘導物質を用いることなく、効率の良い有機化合物の生分解を行なうことができる。

【0109】又、有機化合物で汚染された環境を効率良く、且つ処理されるべき環境に大きな影響を与えることなく修復することができる。

【0110】又、構成的(inherently)に酵素を発現してなる微生物の選択的な取得及び検出を行なうことができる。

【0111】

## 【実施例】

## 実施例1

J M 1株の取得及びオキシゲナーゼ活性

寒天培地上のJ 1株 (FERM BP-5102) のコロニーを、酵母エキス0.1%及びフェノール200ppmを含むM9培地100mlに接種し、坂口フラスコ中30℃で18時間振盪培養を行った。

【0112】次に、上記のように培養した菌液10mlを遠心分離して集菌し、上澄みを除去した後、20ppmのNTG (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン) 及び200ppmのフェノールを含むM9培地を5ml加え、30℃で振盪培養を行った。菌液は2時間から3時間で、フェノールの分解中間生成物である2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒド由来の黄色を呈し始めるので、この時点の菌液を、200ppmのインドール及び、酵母エキス0.1%を含むM9寒天培地上に塗布し、30℃で静置培養を行った。

【0113】通常インドールは、多くの芳香族分解（酸化或いは水酸化）酵素によって変換され、インディゴとなって青色を呈する。

【0114】培養開始から1日後培地上には直径約1~2mm程度のコロニーが目視で認められ、あるコロニー\*

\*は全体が濃い青色を呈しており、又あるコロニーはコロニー本来の色（白色）を保っていた。培養開始から2~3日で殆んどのコロニーは直径が約5mmにまで成長し、コロニー全体が濃青色に着色したコロニーと、直径約5mmの白色のコロニーの中心に直径約1~2mmの濃青色の着色部を有するコロニーとが認められた。

【0115】そこで全体が濃青色に着色しているコロニーを坂口フラスコ中の酵母エキス0.2%のみを含むM9培地200mlに接種し、30℃で24時間振盪培養を行い、遠心分離にて分離した細胞ペレットをフレンチプレスにて破碎した細胞エキスをを用いて、この微生物のカテコール-1, 2-オキシゲナーゼ (C12O) 及びカテコール-2, 3-オキシゲナーゼ (C23O) を、それぞれ分光測定により検出した (Microbiol., 6B, 463-478 (1977))。

【0116】なお、蛋白定量はバイオラッドプロテインアッセイキットにて行った。また対照として、同様の条件でのJ 1株の酵素活性、及び100ppmのフェノールを加えた培地で培養したJ 1株の酵素活性も併せて測定した。結果を表1に示す。

【0117】

表1. J 1株及びJ M 1株のC12O/C23O活性度

菌株 \ 酵素	活性度 (蛋白mg当たりの $\mu\text{mol}/\text{min.}$ )	
	C12O	C23O
着色菌株	0.103	1.96
J 1株 (フェノールなし)	0.011	0.015
J 1株 (フェノールあり)	0.109	1.88

表1の結果から、着色菌株は誘導物質無しで、誘導物質であるフェノール存在下で培養したJ 1株を越えるオキシゲナーゼ活性を示すことから、オキシゲナーゼを本来的に備えた、即ちオキシゲナーゼを構成的に発現している微生物であり、又J 1株とは別の菌株であることが分かった。

【0118】そしてこの菌株の菌学的性質は下記の通りであって、J 1株の示す菌学的性質と同一であった。

【0119】グラム染色性及び形態：グラム陰性桿菌  
各培地における生育  
BHIA：生育良好  
MacConkey：生育可能  
コロニーの色：クリーム色

至適温度：25℃>30℃>35℃

運動性：陰性（半流動培地）

TSI (slant/butt)：アルカリ/アルカリ、H<sub>2</sub>S(-)

オキシダーゼ：陽性（弱）

カタラーゼ：陽性

の発酵

グルコース：陰性

シュクロース：陰性

ラフィノース：陰性

ガラクトース：陰性

マルトース：陰性

ウレアーゼ：陽性



エスクリン加水分解 ( $\beta$ -グルコシダーゼ) : 陽性

硝酸還元 : 陰性

インドール産生 : 陰性

グルコース酸性化 : 陰性

アルギニンジヒドロラーゼ : 陰性

ゼラチン加水分解 (プロテアーゼ) : 陰性

$\beta$ -ガラクトシダーゼ : 陰性

各化合物の同化

グルコース : 陰性

L-アラビノース : 陰性

D-マンノース : 陰性

D-マンニトール : 陰性

N-アセチル-D-グルコサミン : 陰性

マルトース : 陰性

グルコン酸カリウム : 陰性

n-カプリン酸 : 陽性

アジピン酸 : 陰性

d1-リンゴ酸 : 陽性

クエン酸ナトリウム : 陽性

酢酸フェニル : 陰性

以上の結果から、上記の着色菌株は J 1 株に変異源を作用させることによって誘発された、オキシゲナーゼを構成的に発現してなる新規な、J 1 変異株であると認め、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタベスタ条約に基づき下記の国際寄託当局に FERM BP-5352 として寄託した。

【0120】工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市)

次に新たな J 1 株 (FERM BP-5102) を用意し、酵母エキス 0.1% 及びフェノール 200 ppm を含む M9 培地 100 ml に接種し、坂口フラスコ中 30℃ で 18 時間振盪培養を行った。

【0121】次に、上記のように培養した菌液 10 ml を遠心分離して集菌し、上澄みを除去した後、20 ppm の NTG (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン) 及び 200 ppm のフェノールを含む M9 培地を 5 ml 加え、30℃ で振盪培養を行った。菌液は 2 時間から 3 時間で、フェノールの分解中間生成物である 2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒド由来の黄色を呈し始めるので、この時点の菌液を、200 ppm のインドール及び、酵母エキス 0.1% を含む M9 寒天培地に塗布し、30℃ で静置培養を行った。

【0122】ここで培養 1 日後に、目視で認められる全体が濃青色に着色したコロニーと白色のコロニーのうち全体が着色しているコロニーだけをピックアップし、そのコロニーを構成する微生物について上記と同様にしてオキシゲナーゼ活性及び菌学的性質を調べた結果、J M 1 株と認められた。即ち J 1 株の成長とオキシゲナーゼの発現との間に時間差が有るのに対して、J M 1 株はその成長とオキシゲナーゼの発現との間に時間差の無い事

を検出して、菌株の成長とオキシゲナーゼの発現との間に時間差の無い菌株をピックアップすることで J M 1 株を選択的に J 1 株から取得できた。

【0123】実施例 2 から 7 は前駆物質を用いた J 1 株の選択的検出を示す。

【0124】実施例 2

カテコールあるいはフェノールを用いた J M 1 株の検出方法

寒天培地上の J 1 株のコロニー及び実施例 1 のようにして取得した J M 1 株のコロニーを、それぞれ酵母エキス 0.1% を含む M9 培地 100 ml に接種し、坂口フラスコ中 30℃ で 18 時間振盪培養を行った。

【0125】次に各菌液を混合し、この混合菌液を、酸化前駆物質としての 200 ppm のカテコール及び、酵母エキス 0.1% を含む M9 寒天培地上に塗布し、30℃ で静置培養を行った。

【0126】通常カテコールは、多くの芳香族分解 (酸化或いは水酸化) 酵素によって変換され、芳香環のメタ開裂によりヒドロキシムコン酸セミアルデヒド (HMS) となって黄色を呈する。

【0127】その結果、培養開始から 1 日後に直径約 1 ~ 2 mm の全体が黄色に着色したコロニーと、直径約 1 ~ 2 mm の白色のコロニーが認められた。ここで全体が着色したコロニーをピックアップし、その特性を実施例 1 と同様にして調べた結果、J M 1 株と認められた。

【0128】又培養開始から 1 日後にはオキシゲナーゼの存在を示さなかった J 1 株のコロニーも培養開始から 2 日目でコロニー中心部に黄色の着色部分が認められた。

【0129】以上の結果から、微生物の成長とオキシゲナーゼの発現の時間差を利用して J M 1 株を J 1 株と区別して釣菌することができた。

【0130】又、前駆物質としてフェノールを用いても同様の結果が得られた。

【0131】実施例 3

3-メチルカテコールあるいは m-クレゾールを用いた J M 1 株の検出方法

酸化前駆物質としてカテコールの代わりに 3-メチルカテコールを用いた以外は実施例 2 と同様にして J 1 株及び J M 1 株の共存する培地を作成し、30℃ で静置培養を行った。

【0132】通常 3-メチルカテコールは、多くの芳香族分解 (酸化或いは水酸化) 酵素によって変換され、芳香環のメタ開裂により 2-ヒドロキシ-6-ケトヘプター-2, 4-ジエノイック酸 (HOD) となって黄色を呈する。

【0133】3-メチルカテコールを 200 ppm、酵母エキス 0.1% を含む M9 培地上で J 1 株を培養した場合、培養開始から一日以内に目視で確認可能なサイズのコロニーに成長し、培養開始から二日目に該コロニーに



HODの存在を示す黄色の部分が発現してくる。

【0134】これに対してJ M 1株は微生物の成長とHODの発現との間に時間差が認められず、コロニーが目視可能になった時点（培養開始から一日以内）で該コロニーは黄色を呈していた。そして微生物が目視可能なサイズのコロニーにまで成長した時点で黄色に呈色しているコロニーをJ M 1株としてJ 1株から区別して検出することができた。

【0135】また3-メチルカテコールに代えて前駆物質としてm-クレゾールを用いても上記と同様の結果が得られた。

#### 【0136】実施例4

3-トリフルオロメチルカテコールあるいはm-トリフルオロメチルフェノールを用いたJ M 1株の検出方法  
酸化前駆物質としてカテコールの代わりに3-トリフルオロメチルカテコールを用いた以外は実施例2と同様にしてJ 1株及びJ M 1株の共存する培地を作成し、30℃で静置培養を行った。

【0137】通常3-トリフルオロメチルカテコールは、多くの芳香族分解（酸化或いは水酸化）酵素によって変換され、芳香環のメタ開裂により7, 7, 7-トリフルオロ-2-ヒドロキシ-6-オキソ-2, 4-ヘプタジエノイック酸（TFHA）となって黄色を呈する。

【0138】3-トリフルオロメチルカテコールを200ppm、酵母エキス0.1%を含むM9培地上でJ 1株を培養した場合、培養開始から一日以内に目視で確認可能なサイズのコロニーに成長し、培養開始から二日目に該コロニーにTFHAの存在を示す黄色の部分が発現してくる。

【0139】これに対してJ M 1株は微生物の成長とTFHAの発現との間に時間差が認められず、コロニーが目視可能になった時点（培養開始から一日以内）で該コロニーは黄色を呈していた。そして微生物が目視可能なサイズのコロニーにまで成長した時点で黄色に呈色しているコロニーをJ M 1株としてJ 1株から区別して検出することができた。

【0140】また3-トリフルオロメチルカテコールに代えて前駆物質としてm-トリフルオロメチルフェノールを用いても上記と同様の結果が得られた。

#### 【0141】実施例5

クレオソートを用いたJ M 1株の検出方法  
酸化前駆物質としてカテコールの代わりにクレオソートを用い、実施例1と同様にしてJ 1株及びJ M 1株の共存する培地を作成し30℃で静置培養した。

【0142】通常クレオソートは、多くの芳香族分解（酸化或いは水酸化）酵素によって変換され、赤紫色を呈する。

【0143】そしてJ 1株をクレオソート200ppm、酵母エキス0.1%を含むM9培地上で培養すると培養開始から一日以内に目視可能なサイズのコロニーに

成長し、2日目に該コロニーに赤紫色の部分が発現してくる。

【0144】これに対しJ M 1株は微生物の成長とクレオソート酸化物の発現との間に時間差が認められず、コロニーが目視可能になった時点（培養開始から1日以内）で該コロニーはクレオソート酸化物の呈色を示していた。そして目視可能なサイズのコロニーに成長した時点で赤紫色に呈色しているものをJ M 1株としてJ 1株から区別して検出することができた。

#### 【0145】実施例6

インドールを用いたFCMによるJ M 1株の検出方法  
寒天培地上のJ 1株のコロニー及び実施例1のようにして取得したJ M 1株のコロニーを、それぞれ酵母エキス0.1%含むM9培地100mlに接種し、前培養として坂口フラスコ中30℃で18時間振盪培養を行った。

【0146】次に各菌液0.1mlを、酸化前駆物質としての200ppmのインドール及び酵母エキス0.1%を含むM9培地30mlに添加し、30℃で振盪培養を行った。

【0147】インドールは前記した様に芳香族分解酵素（酸化或いは水酸化酵素）によってインディゴに変換されるが、その過程で形成される中間生成物インドキシルが緑色蛍光を発する。

【0148】J 1株はインドールを200ppm、酵母エキスを0.1%含むM9培地で培養すると培養開始から24時間後にインドキシル由来の緑色蛍光を発する様になる。

【0149】これに対し、J M 1株は10時間程度でインドキシル由来の緑色蛍光を発する様になる。

【0150】そこで10時間振盪培養を行った後、この培養液より遠心分離によって集菌したペレットを、任意の割合で菌濃度 $10^5 \sim 10^6$  cells/mlとなるようにシース液に再分散し、ベクトンディッキンソン社製FCMであるFacs-Canで菌数を測定した。その結果、細胞の大きさ等に由来するFSC（前方散乱）では同一のピークを示したものの、インドキシルの蛍光に対応して分光検出するチャンネルの蛍光ヒストグラムにおいて一定幅の信号レベルでゲーティングを行い、J M 1の細胞をJ 1の細胞と区別することが可能であった。

#### 【0151】実施例7

インドールを用いた蛍光顕微鏡によるJ M 1株の検出及び単離方法

寒天培地上のJ 1株のコロニー及び実施例1のようにして取得したJ M 1株のコロニーを、それぞれ酵母エキス0.1%含むM9培地100mlに接種し、前培養として坂口フラスコ中30℃で18時間振盪培養を行った。

【0152】次に各菌液0.1mlを、酸化前駆物質としての200ppmのインドール及び酵母エキス0.1%を含むM9培地30mlに添加し、30℃で10時間

振盪培養を行った。この培養液より遠心分離によって集菌したペレットを、任意の割合で菌濃度  $10^2 \sim 10^3$  cells/ml となるように M9 培地 (炭素源含まず) に再分散した後、96穴マイクロプレートに限界希釈した。

【0153】作成した標本は、落射蛍光顕微鏡 (オリンパス社製 IMT-2) を使用して蛍光観察を行った。

【0154】その結果、細胞そのものが、インドキシルに由来すると思われる緑色の蛍光を発したものは JM1 株であり、蛍光を発しない細胞は J1 株であることが、インドールを用いた寒天培地上でのコロニーの呈色で確認された。

【0155】実施例8から11は JM1 株を用いた有機化合物の分解を示す。

#### 【0156】実施例8

JM1 株による TCE の分解 (液体培養系)

実施例1のようにして取得した JM1 株の寒天培地上のコロニーを、坂口フラスコ中の酵母エキス 0.2% を含む M9 培地 200 ml に接種し、30℃で24時間振盪培養を行った。

【0157】次に複数本のバイアル瓶 (vial) を用意し、各々に TCE 10 ppm、炭素源として 0.1% 酵母エキスを含む M9 培地 5 ml 及び上記の様に培養した菌液 0.1 ml を接種し、ブチルゴム栓 (butyl rubber stopper) 及びアルミニウムキャップでシールし 30℃で振盪培養した。

【0158】そしてヘッドスペース法によりガスクロマトグラフィーによって TCE 量を経時的に測定した。対照として、同様の実験系において JM1 株を加えない系での TCE 量の経時的な定量も併せて行い、対照の TCE 量に対する TCE 残存率を求めた。結果を図1に示す。

#### 【0159】実施例9

JM1 株による DCE の分解 (液体培養系)

培地中の分解対象物質を cis-1, 2-ジクロロエチレン (cis-1, 2-DCE) 及び trans-1, 2-ジクロロエチレン (trans-1, 2-DCE) それぞれ 10 ppm とした他は実施例8と同様の方法で経時的に DCE の減少を測定した。そして各々の対照サンプルの DCE 量に対する DCE 残存率を求めた。結果を図2 (cis-1, 2-DCE) 及び図3 (trans-1, 2-DCE) に示す。

#### 【0160】実施例10

JM1 株による芳香族化合物の分解 (液体培養系)

培地中の炭素源を 0.1% 酵母エキスとし、分解対象物質をフェノール (濃度 200 ppm)、o-クレゾール (濃度 200 ppm)、m-クレゾール (濃度 200 ppm)、p-クレゾール又はトルエン (濃度 50 ppm) とした他は実施例8と同様の方法で経時的に各化合物の減少を測定した。測定は、フェノール及びクレゾー

ルは液体クロマトグラフィーにて、トルエンはガスクロマトグラフィーにて行った。そして各々の対照サンプルの芳香族化合物量に対する残存率を求めた。その結果を図4に示す。

#### 【0161】実施例11

J1 株と JM1 株の増殖及び TCE 分解の比較 (液体培養系)

実施例8と同様の方法で、下記の3種類のタイプのサンプルグループを作成して、微生物の増殖 (菌数) と TCE 分解 (残留 TCE 濃度) を経時的に測定した。

【0162】菌数の測定にはプレートカウント法を用い、TCE 量の測定にはガスクロマトグラフィーを用いた。そして TCE 量については対照サンプルの TCE 量に対する TCE 残存率を求めた。その結果を図5に示す。

#### 【0163】グループ1 微生物: J1 株

培地中の炭素源: 0.1% 酵母エキス

培地中の誘導物質: フェノール (濃度 200 ppm)

#### グループ2 微生物: J1 株

培地中の炭素源: 0.1% 酵母エキス

培地中の誘導物質: なし

#### グループ3 微生物: JM1 株

培地中の炭素源: 0.1% 酵母エキス

培地中の誘導物質: なし

実施例12から16は JM1 株を用いた汚染土壌の修復を示す。

#### 【0164】実施例12

JM1 株による土壌中 TCE の分解処理 (15℃、褐色森林土)

実施例8においてバイアル瓶の内容物を下記 (a) - (d) の混合物に代えた以外は実施例8と同様にサンプルを作成し、該サンプルを実際の土壌中の温度に近い 15℃で静置培養して、TCE 量の経時変化をヘッドスペース法によりガスクロマトグラフィーによって測定した。

【0165】また対照として JM1 株を加えない以外は全く同様に調製したサンプルを用いて TCE 量の変化を測定した。

【0166】そして実施例12のサンプルの TCE 量の経時変化を対照サンプルの TCE 量に対する TCE 残存率として求めた。その結果を図6に示す。

【0167】(a) 汚染物質: TCE (20 ppm)

(b) 0.1% 酵母エキスを含む M9 培地 1 ml

(c) 褐色森林土 4 g

(d) JM1 培養菌液 0.1 ml

#### 実施例13

JM1 株による土壌中 TCE の分解処理 (15℃、ローム土)

土壌サンプルをローム土とした以外は実施例12と同様の方法で TCE 量の減少を経時的に測定し、実施例12

と同様に对照サンプルのTCE量に対するTCE残存率を求めた。その結果を図7に示す。

#### 【0168】実施例14

JM1株による土壤中TCEの分解処理(15℃、細砂土)

土壤サンプルを細砂土(シルト含有率:約10%)とした以外は実施例12と同様の方法でTCE量の減少を経時的に測定し、実施例12と同様に对照サンプルのTCE量に対するTCE残存率を求めた。その結果を図8に示す。

#### 【0169】実施例15

JM1株による土壤中DCEの分解処理(15℃、褐色森林土)

実施例12において汚染物質TCEを下記の3種類のDCEに代えた以外は実施例12と同様にして経時的にDCE量の減少を測定し、对照サンプルのDCE量に対するDCE残存率を求めた。その結果を図9に示す。

【0170】(1) cis-1, 2-ジクロロエチレン(5 ppm)

(2) trans-1, 2-ジクロロエチレン(5 ppm)

(3) 1, 1-ジクロロエチレン(5 ppm)

#### 実施例16

JM1株による土壤中フェノールの分解処理(15℃、褐色森林土)

実施例12において汚染物質TCEをフェノールに代えた以外は実施例12と同様にして経時的にフェノール量の減少を測定した。

【0171】フェノールの定量は、アミノアンチピリンを用いて日本工業規格(JIS K0102-1993、28.1)に準じて行った。

【0172】そして对照サンプルのフェノール量に対するフェノール残存率を求めた。その結果を図10に示す。

【0173】実施例17から22はJM1株を用いた汚染気体の修復を示す。

#### 【0174】実施例17

JM1株を用いた、培養液曝気による気相中のTCE分解処理

先ず実施例8と同様にしてJM1株の培養菌液を作成した。

【0175】次に複数本のバイアル瓶を用意し、それぞれのバイアル瓶に0.1%酵母エキスを含むM9培地30ml及び上記JM1株の培養菌液0.1mlを加えた。その後TCE飽和水溶液中で曝気した空気を流量60ml/分で各バイアル瓶の溶液中に30分間流し、その後ブチルゴム栓及びアルミシールで完全に密封し30℃で振とう培養を行った。

【0176】そしてヘッドスペース法によりガスクロマトグラフィで定量し経時的なTCE量の減少を測定し

た。

【0177】また对照としてJM1株を加えない以外は上記と全く同様の方法で調製したサンプルを用いてTCE量の変化を測定した。

【0178】そして実施例17のサンプルのTCE量の経時変化を对照サンプルのTCE量に対するTCE残存率として求めた。その結果を図11に示す。

#### 【0179】実施例18

JM1株を用いた、培養液曝気による気相中のDCE分解処理

実施例17において各バイアル瓶中に流したTCE飽和水溶液中で曝気した空気を、下記の(1)、(2)又は(3)のDCE飽和水溶液中で曝気した空気に代えた以外は実施例17と同様にして気相中のDCE量の経時的な減少を測定し、对照サンプルのTCE量に対する残存率を求めた。その結果を図12に示す。

【0180】(1) cis-1, 2-ジクロロエチレン

(2) trans-1, 2-ジクロロエチレン

(3) 1, 1-ジクロロエチレン

#### 実施例19

JM1株を用いた、培養液曝気による気相中のトルエン分解処理

実施例17において各バイアル瓶中に流したTCE飽和水溶液中で曝気した空気を、トルエン飽和水溶液中で曝気した空気に代えた以外は実施例17と同様にして気相中のトルエン量の経時的な減少を測定した。気相中のトルエン量はヘッドスペース法によりガスクロマトグラフィで定量した。

【0181】そして実施例17と同様に对照サンプルのトルエン量に対するトルエン残存率を求めた。その結果を図13に示す。

#### 【0182】実施例20

JM1株を用いた、土壤通気による気相中のTCEの分解処理

先ず実施例8と同様にしてJM1株の培養菌液を作成した。

【0183】次に複数本のバイアル瓶を用意し、それぞれのバイアル瓶に0.1%酵母エキスを含むM9培地30ml及び上記JM1株の培養菌液0.1mlを加えた。

【0184】次いで各バイアル瓶中に滅菌した褐色森林土を液面まで加え、ブチルゴム栓でシールし30℃で終夜放置した後、ブチルゴム栓を取り、各バイアル瓶中の過剰の培養液をデカントして取り除いた。

【0185】次に各バイアル瓶中の土壤に、TCE飽和水溶液を通過させて曝気した空気を流量60ml/分で30分間流し、その後各バイアル瓶をブチルゴム栓及びアルミキャップで完全にシールし、30℃で静置培養した。

【0186】そして、実施例17と同様に对照サンプル

のTCE量に対するTCE残存率を求めた。その結果を図14に示す。

#### 【0187】実施例21

JM1株を用いた、培養液中連続曝気による気相中TCEの分解処理

複数本のバイアル瓶を用意し、その各々に実施例17と同様のJM1株の菌液0.1ml及び、0.1%酵母エキスを含む30mlのM9培地を加えた。次いで各バイアル瓶にTCE飽和溶液を通過させて曝気した空気を流量0.5ml/分で溶液中に連続して流しながら、30℃で静置培養を行った。TCE量は、流出してきた空気中のTCEをガスクロマトグラフィで定量することにより行い、経時的にTCE量を測定した。そして実施例17と同様に対照サンプルのTCE量に対するTCE残存率を求めた。結果を図15に示す。

#### 【0188】実施例22

JM1株を用いた、土壌連続曝気による気相中TCEの分解処理

複数本のバイアル瓶を用意し、その各々に実施例17と同様のJM1株の菌液0.1ml及び、0.1%酵母エキスを含む30mlのM9培地を加え、さらに滅菌した褐色森林土を水面まで加えた。プチルゴム栓で封をして30℃で終夜放置の後、過剰の培養液をデカントして取り除いた。次いで各バイアル瓶中の土壌中にTCE飽和溶液中で曝気した空気を流量0.5ml/分で連続して流しながら、30℃で静置培養を行った。TCE量は、流出してきた空気中のTCE量をガスクロマトグラフィで定量することにより行い、経時的にTCE量を測定した。そして実施例17と同様に対照サンプルのTCE量に対するTCE残存率を求めた。結果を図16に示す。

す。

#### 【0189】

【発明の効果】本発明によって、誘導物質を必要としないで、環境汚染物質を分解することが可能になり、高価な設備や経費を要求することなく環境浄化が可能となった。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】実施例8におけるTCEの分解を示す図。

【図2】実施例9におけるcis-DCEの分解を示す図。

【図3】実施例9におけるtrans-DCEの分解を示す図。

【図4】実施例10における芳香族化合物の分解を示す図。

【図5】実施例11におけるTCEの分解及び菌の増殖を示す図。

【図6】実施例12におけるTCEの分解を示す図。

【図7】実施例13におけるTCEの分解を示す図。

【図8】実施例14におけるTCEの分解を示す図。

【図9】実施例15におけるDCEの分解を示す図。

【図10】実施例16におけるフェノールの分解を示す図。

【図11】実施例17におけるTCEの分解を示す図。

【図12】実施例18におけるDCEの分解を示す図。

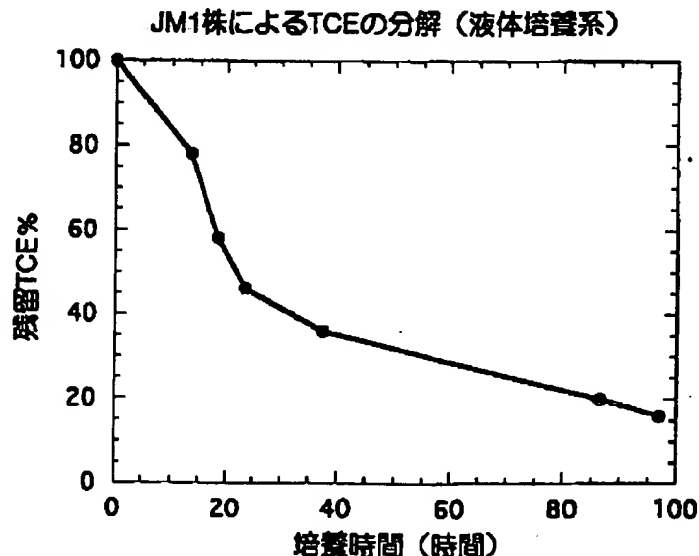
【図13】実施例19におけるトルエンの分解を示す図。

【図14】実施例20におけるTCEの分解を示す図。

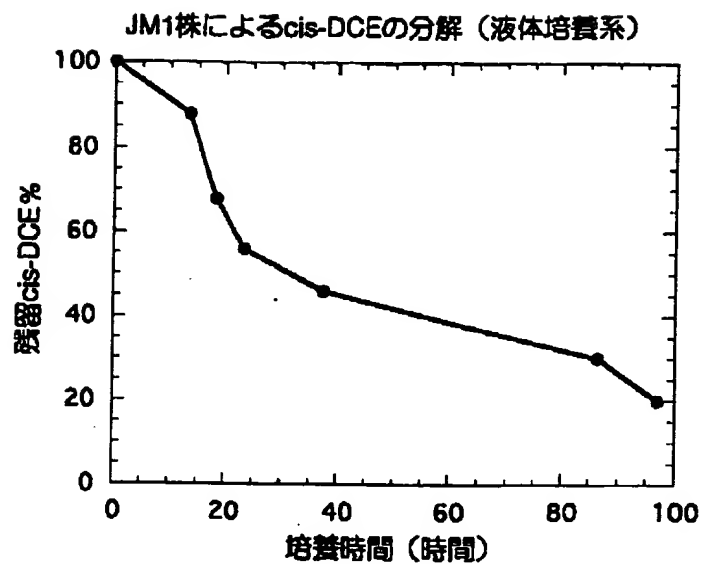
【図15】実施例21におけるTCEの分解を示す図。

【図16】実施例22におけるTCEの分解を示す図。

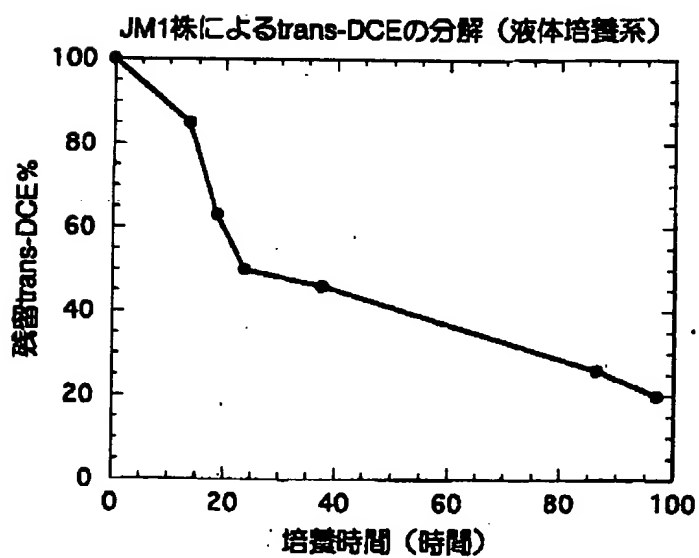
【図1】



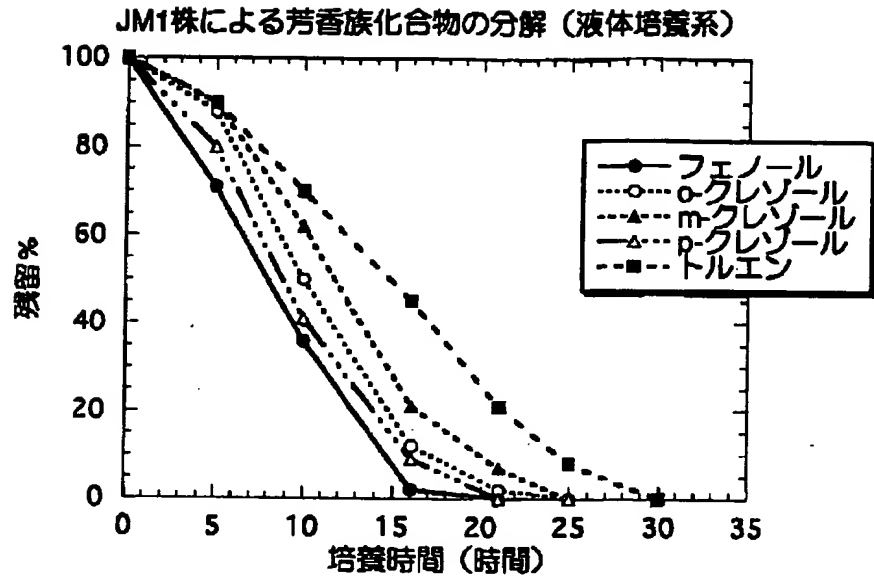
【図2】



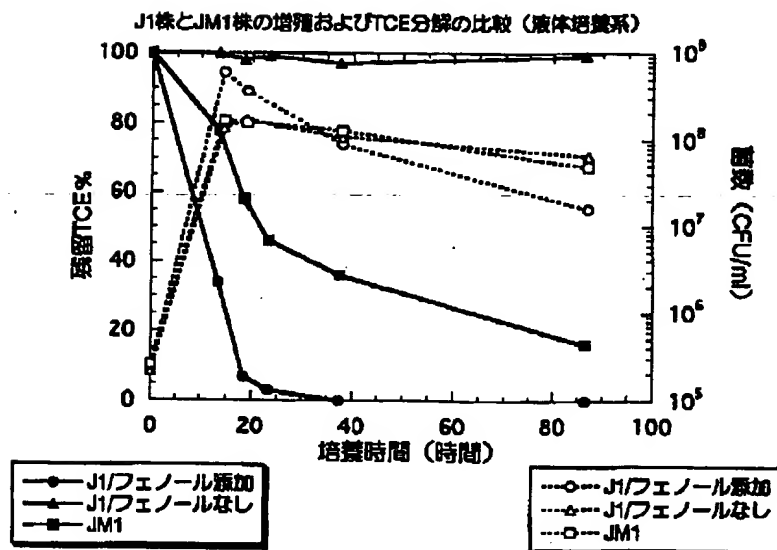
【図3】



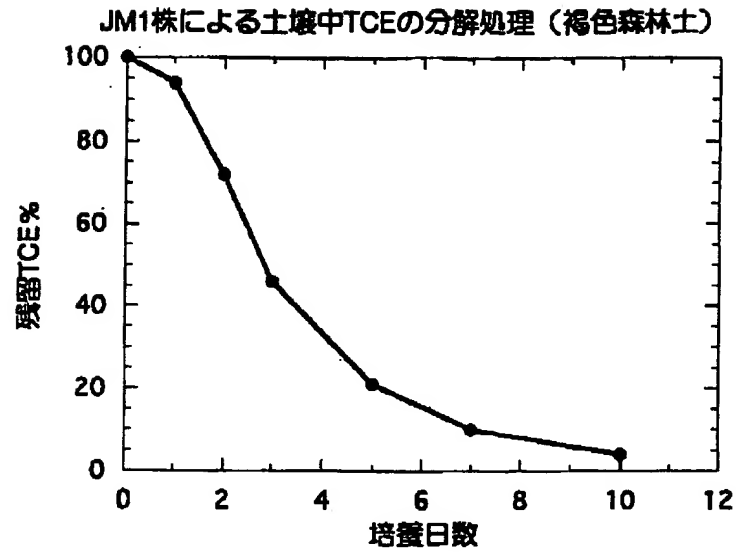
【図4】



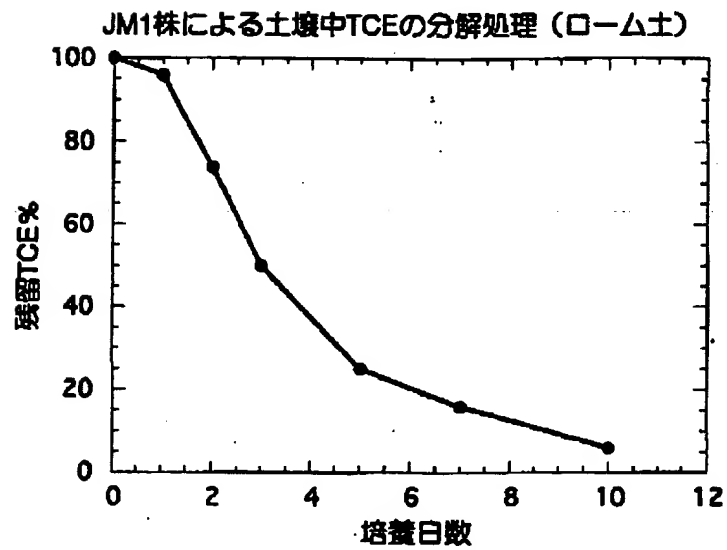
【図5】



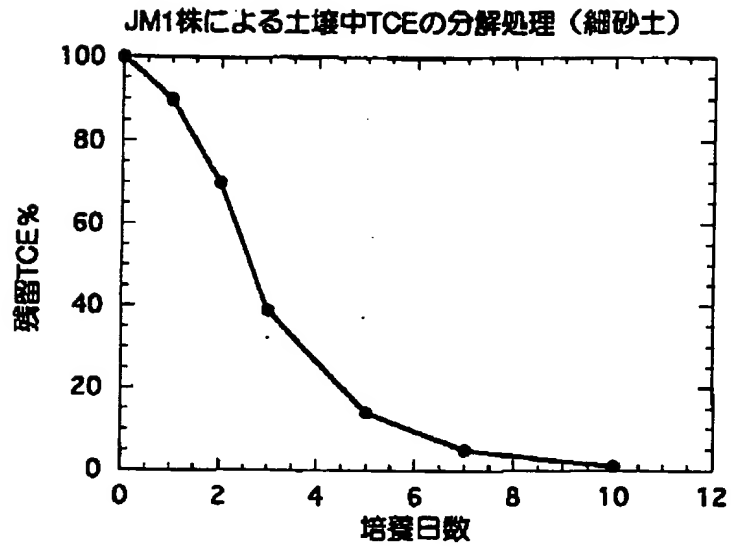
【図6】



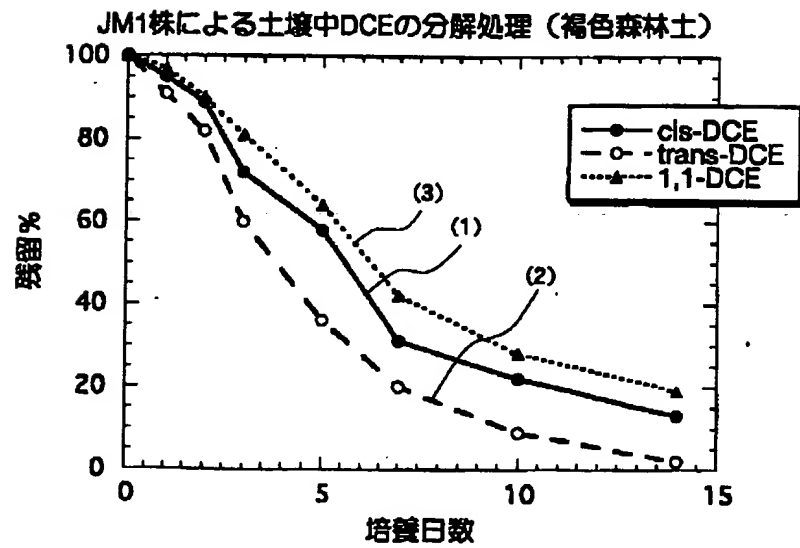
【図7】



【図8】

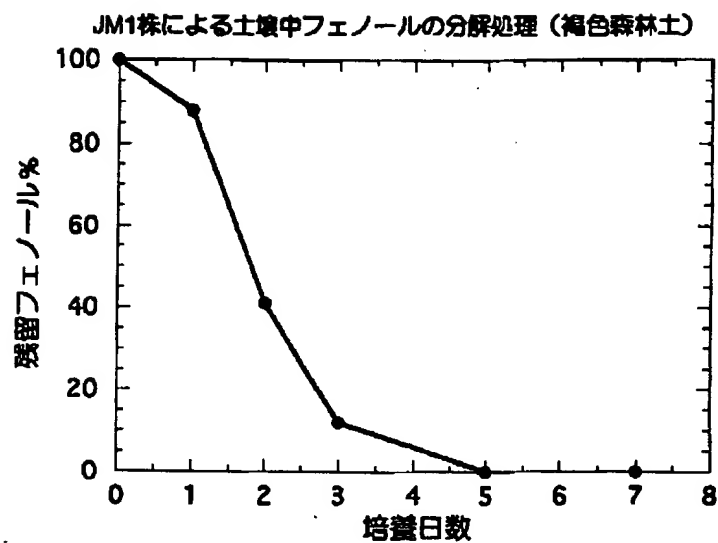


【図9】

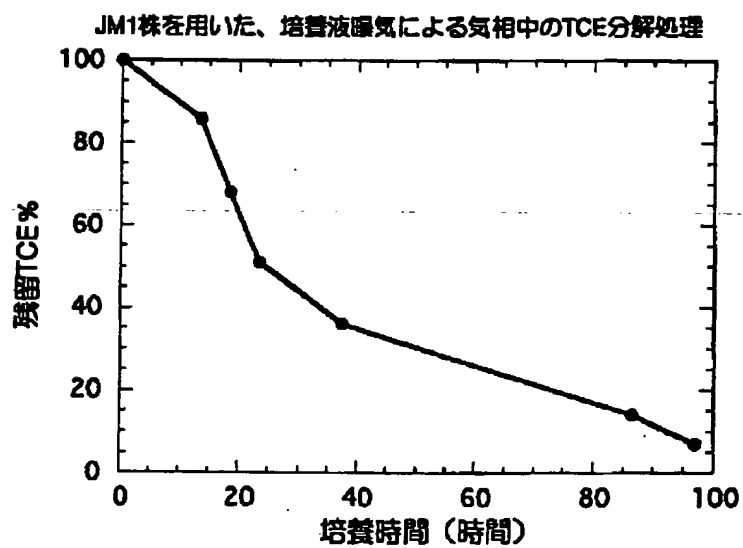




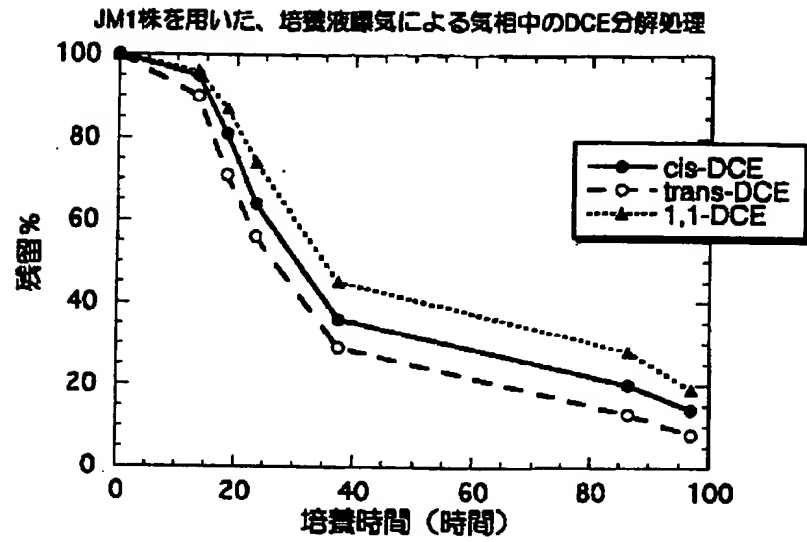
【図10】



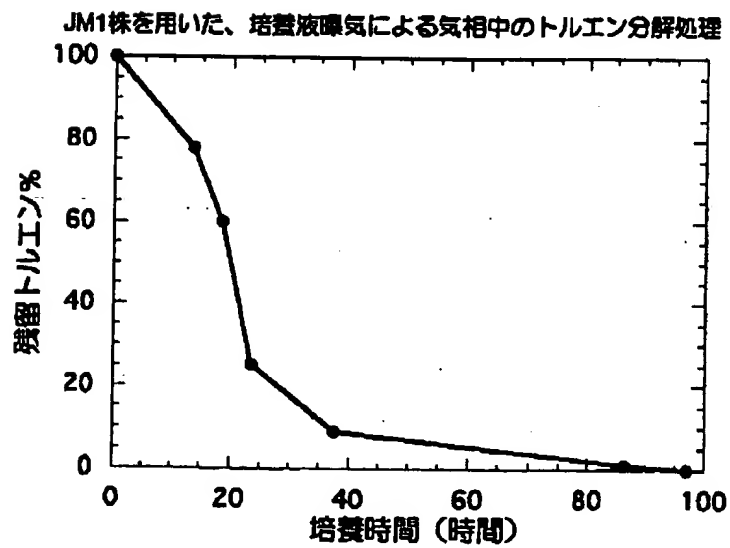
【図11】



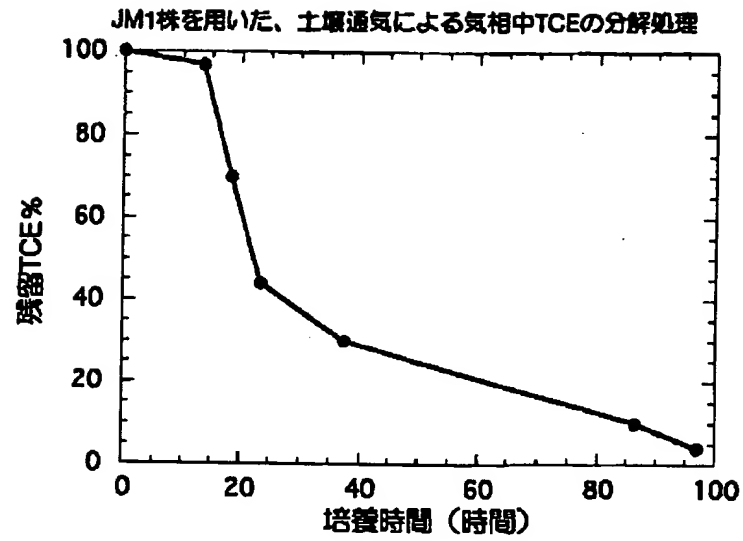
【図12】



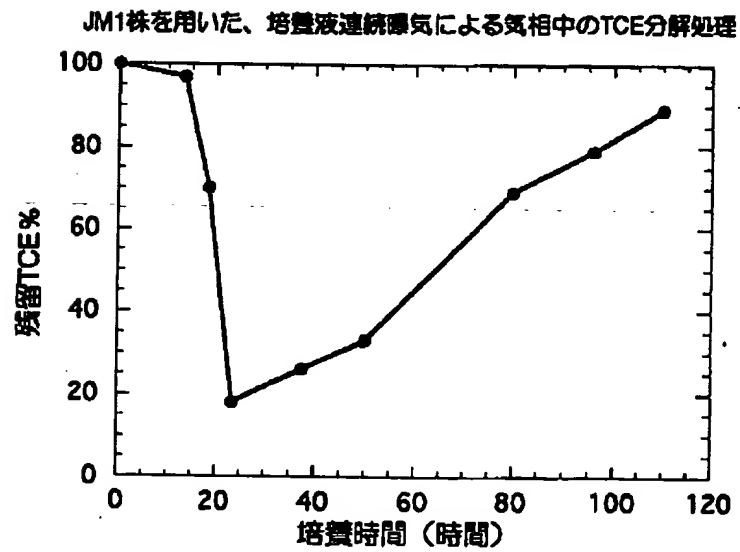
【図13】



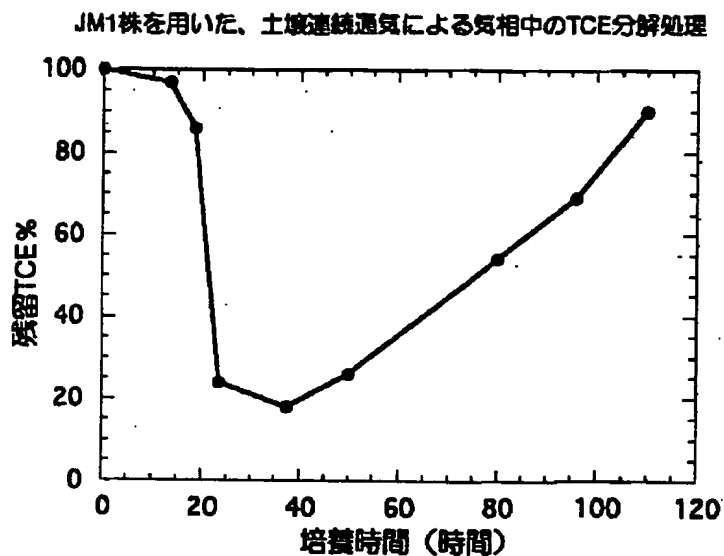
【図14】



【図15】



【図16】



フロントページの続き

(51)Int. Cl. 6

C 0 2 F 3/34

/(C 1 2 N 1/20

C 1 2 R 1:15)

識別記号

ZAB

庁内整理番号

F I

B 0 9 B 3/00

技術表示箇所

ZABE

(72)発明者 川口 正浩

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ  
ノン株式会社内

(72)発明者 川畑 祐司

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ  
ノン株式会社内